

**Enzimek hőstabilitásának szerkezeti alapjai:
a láncvégek közötti kölcsönhatások szerepe**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Kamondi Szilárd

Témavezető:

Dr. Závodszy Péter

intézet igazgató

MTA rendes tagja

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolája,

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Gráf László

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében

Budapest

2008

Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek és egyben az intézet igazgatójának, Dr. Závodszy Péter akadémikusnak, aki munkámat irányította és támogatta. Köszönöm csoportunk tagjainak, Dr. Szilágyi Andrásnak, Dr. Gál Péternek, Barna Lászlónak, Hajdú Istvánnak, akik munkájukkal, illetve tanácsaikkal nagyban hozzájárultak e dolgozat létrejöttéhez.

Köszönet illeti a csoport és az Enzimológiai Intézet minden munkatársát, akik segítségemre voltak az elmúlt évek során.

Köszönetet szeretnék továbbá mondani Dr. Friedrich Péternek, az Enzimológiai Intézet korábbi igazgatójának, és Dr. Erdei Annának, a Biológiai Doktori Iskola vezetőjének illetve Dr. Gráf Lászlónak, a Szerkezeti Biokémia Doktori Program vezetőjének.

Végül de nem utolsósorban köszönöm feleségemnek, kislányomnak és szüleimnek, hogy támogattak és mellettem álltak dolgozatom elkészítésének éveitől kezdve.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Ábrák jegyzéke	5
Táblázatok jegyzéke	6
Rövidítések, fizikai mennyiségek	7
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. Enzimek stabilitása	10
2.2. Termodinamikai stabilitás	10
2.3. Kinetikai stabilitás	13
2.4. Termofil enzimek tulajdonságai	15
2.5. Fehérje adatbázisok elemzése, szerkezeti elemek szerepe a stabilitásban	15
2.6. Mezofil és (hiper)termofil enzimek filogenetikai összehasonlítása	19
2.7. Modell enzimek: cellulázok és xilanázok	19
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek	26
4.1. Vegyszerek, anyagok	26
4.2. Baktériumtörzsek	26
4.3. Expressziós rendszerek	27
4.4. Celluláz és xilanáz enzimek	28
4.5. Oligonukleotiddal irányított mutagenézis	29
4.6. Irányított family shuffling	30
4.7. Fehérje tisztítás	33
4.8. Enzimaktivitás mérése és a fehérjekoncentráció meghatározása	33
4.9. Spektropolarimetria és differenciális pásztázó mikrokaloimetria	35

4.10. Guanidin-hidroklorid denaturációs mérések	35
4.11. Diszulfidhíd-tervezés, homológiamodellezés, kontaktusenergia-számítás	36
4.12. Egyéb alkalmazott módszerek.....	37
5. Eredmények és értelmezésük	38
5.1. Mutáns celluláz C enzim tervezése	38
5.1.1. Diszulfidhíd kialakítása irányított mutagenézis módszerrel	38
5.1.2. A mutáns celluláz C enzim hőstabilitásának jellemzése	40
5.2. Xilanáz kimérák tervezése	44
5.2.1. Kiméra xilanázok előállítása irányított family shuffling módszerrel	44
5.2.2. A vad típusú és a kiméra xilanázok hőstabilitásának jellemzése	45
5.2.3. A vad típusú és a kiméra xilanázok reakciókinetikai paraméterei	50
5.2.4. A láncvégek közötti kölcsönhatási energia számítása	52
6. Következtetések	54
7. Összefoglalás.....	56
Hivatkozások	60

Ábrák jegyzéke

- 2.1. ábra Stabilizációs stratégiák
- 2.2. ábra A cellulóz szerkezete
- 2.3. ábra A *Clostridium thermocellum* celluláz C szerkezete több nézetben
- 4.1. ábra A TmxAcat és TmxB fehérjék nukleotid szekvenciáinak összerendezése
- 4.2. ábra A számítógépes tervezésnél vizsgált χ^1 és χ^{SS} torziószög
- 5.1. ábra. Az A6C és R340C mutációk hatására megvalósuló diszulfidhíd modellje
- 5.2. ábra Hőinaktivációs mérések a celluláz C diszulfidhidat tartalmazó mutációján
- 5.3. ábra Hődenaturációs mérések a celluláz C diszulfidhidat tartalmazó mutációján
- 5.4. ábra A kiméra és a vad típusú xilanázok optimális működési hőmérsékletei a TmxB enzimből származó szekvenciárészlet százalékában
- 5.5. ábra A vad típusú enzimek és a legstabilisabb kiméra aktivitás profilja a hőmérséklet függvényében
- 5.6a. ábra A vad típusú enzimek és a kiválasztott kimérák kalorimetriás görbéi
- 5.6b. ábra A vad típusú enzimek és a legstabilisabb kiméra kalorimetriás görbéi
- 5.7. ábra A kiméra xilanázok k_{cat}/K_m értékeinek függése a hipertermofil enzimből származó szekvenciárészlet arányától
- 5.8. ábra Az enzimek N- és C-terminálisa közötti számított kölcsönhatási energia

Táblázatok jegyzéke

- 2.1. táblázat Néhány szerkezeti elem megfigyelt összefüggése a termikus stabilitással
- 2.2. táblázat Összefüggés a hőmérséklet és az egyes szerkezeti tényezők között
- 4.1. táblázat A celluláz és a xilanáz enzimek klónozásához használt PCR primerek
- 4.2. táblázat A diszulfidhíd kialakításához használt mutagenézis primerek
- 4.3. táblázat A kiméra gének előállításához használt primerek DNS szekvenciái
- 5.1. táblázat Guanidin-hidroklorid denaturációs mérések összefoglalása
- 5.2. táblázat A kiméra konstrukciók sematikus ábrázolása, feltüntetve az optimális működési hőmérsékletüket
- 5.3. táblázat A vad típusú és a kiméra enzimek optimális működési hőmérsékletei (T_{opt}) és olvadáspontjai (T_{m1} and T_{m2}).
- 5.4. táblázat A vad típusú és az enzimaktivitást mutató kimérák kinetikai paraméterei xilán szubsztráton

Rövidítések, fizikai mennyiségek

ΔG	(Gibbs-féle) szabadentalpia különbség
A	abszorbancia
bp	bázispár
BSA	bovine serum albumin
CD	Circular Dichroism Spectroscopy (cirkuláris dikroizmus spektroszkópia)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (differenciális pásztázó kalorimetria)
DTT	dithiotreitol (ditiotreitol)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (etiléndiamin-tetraecetsav)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (gyors fehérje-folyadékkromatográfia)
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (izopropil-béta D-tiogalakto- -piranozid)
k	sebességi állandó
kDa	kiloDalton
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (nátrium dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
T_m	oladási hőmérséklet
T_{opt}	optimális működési hőmérséklet
TRIS	Tris-(hydroxy-methylamino)-methane (trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán)

1. Bevezetés

Régi megfigyelés, hogy bizonyos melegvízi források vizét a benne élő mikroorganizmusok elszínezik, ami virágzó életközösségekre utal. A XVII. században megkezdődött e hőforrások kémiai analízise először Robert Boyle, majd később az 1800-as években Bunsen által. A XX. században a kémiai analízist biológiai vizsgálatok követték, de a megfelelő technikák hiányában csak az 1960-as évek végén vált lehetővé mikroorganizmusok izolálása magas hőmérsékletű hőforrásokból. Az izolált mikroorganizmusok képesek voltak a forró környezetben is életben maradni, sőt magas hőmérsékleten növekedtek, szaporodtak igazán optimálisan. (Brock, 1967). Az akkoriban izolált baktériumokat extrém termofileknek nevezték el, ma már azonban az extrém jelző magasabb hőmérsékletet jelöl. A hatvanas évek végén felfedezett *Thermus aquaticus* 75°C-os optimális növekedési hőmérsékletével még különlegesnek számított, ma már azonban ismerünk olyan mikroorganizmust is, amely képes akár 113°C-on is növekedni (*Pyrococcus fumarii*) és túlélni az autoklávozást (1 h, 121°C). Lehetséges, hogy ez még mindig nem jelenti a földi élet létezésének felső hőmérséklet határát, hiszen a kutatás tovább folyik olyan nagy hidrosztatikai nyomású, magas hőmérsékletű tengerfenéki vulkanikus területeken, ahonnan már eddig is sok hipertermofil fajt izoláltak. A tengerfenék nagy mélységeiben, ahol a víz forráspontja jóval magasabb az általunk megszokott értéknél, találunk olyan vulkanikusan aktív területeket, ahol a hőmérséklet akár 300 Celsius fok fölé is emelkedhet. Fizikai-kémiai megfontolások azonban azt valószínűsítik, hogy 140 Celsius foknál magasabb hőmérsékleten az életfolyamatokhoz nélkülözhetetlen szerves vegyületek instabilitása megkérdőjelezi az általunk ismert életfolyamatok fenntarthatóságát.

Ma azokat az élőlényeket nevezzük hipertermofileknek, amelyek 80 °C feletti hőmérséklet tartományban növekednek optimálisan. Kizárólag az eubaktériumok és archeák között találunk ilyeneket, amelyek azonban elterjedtek a legtöbb természetes és mesterséges, magas hőmérsékletű környezetben. Termofilnek nevezzük azokat az élőlényeket, amelyek az 50 és 80 °C közötti hőmérsékleti tartományban növekednek optimálisan. Ezek már nem kizárólag a

baktériumok és acrheák közül kerülnek ki, találhatunk közöttük eukariótákat is.

Nem csak hőmérsékleti szempontból lehet egy élőhely extrém, vannak különlegesen nagy hidrosztatikai nyomású környezetek, mint az óceánok aljzata (az itt élő élőlények az ún. barofilek), extrém pH-jú környezetek vulkanikus területeken (acidofilek, alkalifilek), nagy sókoncentrációjú tavak (halofilek), illetve megemlítendők még a különlegesen alacsony hőmérsékletű élőhelyek, amelyeket pszichrofil élőlények népesítenek be.

Egy régi, de még jelenleg is vitatott elmélet szerint az első kifejlődött élőlények a földtörténet során hipertermofil mikroorganizmusok lehettek. Az elmélet valószínűsíti, hogy 3,5 milliárd évvel ezelőtt – az élet kialakulásának időpontjában – a földi környezet hasonló lehetett némely ma élő hipertermofil mikroorganizmus élőhelyéhez, így ezek a mikroorganizmusok a legkorábban kifejlődött élőlényekhez nagyon hasonlóak lehetnek. Alátámasztja ezt az elméletet, hogy a riboszómális DNS vizsgálatok alapján felállított evolúciós fa első elágazásaihoz közel -a legősibb élőlények között- túlnyomórészt hipertermofil baktériumokat, archeákat találunk. Ezek beható vizsgálata segítséget nyújthat az élet kialakulásának megismeréséhez is.

Hipertermofil, termofil mikroorganizmusokból származó enzimek (termofil enzimek vagy termozimek) vizsgálata további fontos ismereteket szolgáltathat elméleti és gyakorlati szempontból is. Elméleti szempontból a termofil enzimek alkalmas modell rendszerek fehérje evolúciós, fizikai-kémiai, fehérjekémiai vizsgálatokhoz. Gyakorlati szempontból pedig a biotechnológiai, ipari alkalmazások egyre szaporodó száma mutatja fontosságukat.

Munkám során a hasonló tulajdonságú, de különböző stabilitású enzimek vizsgálatával a fehérjék magas hőmérséklethez történő adaptációját, illetve ennek szerkezeti alapjait tanulmányoztam. Termofil és hipertermofil enzimek összehasonlításával, modell enzimek segítségével próbáltam a hőstabilitás jelenségét, megérteni és általános következtetéseket levonni a fehérjék stabilizációs stratégiájára, ugyancsak célom volt olyan a gyakorlatban is alkalmazható módszer kifejlesztése, amelynek segítségével egy-egy enzim hőstabilitása a funkció megőrzése mellett változtatható.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimek stabilitása

Enzimek hőstabilitása alatt két fogalmat különböztethetünk meg, beszélhetünk kinetikai vagy termodinamikai stabilitásról. A termodinamikai stabilitás fizikai-kémiai definíciója az enzim stabilizációs szabadentalpiáján (ΔG) és denaturációs (olvadási) hőmérsékletén (T_m) alapul. Nehéz olyan hőmérsékletet találni, ahol a nagyobb fehérjék (30 kDa felett) hődenaturációja reverzibilis. Az irreverzibilis denaturáció esetén nem lehetséges a denaturációs szabadentalpia-változás meghatározása, valamint korrekt termodinamikai analízis végrehajtása. A kinetikai stabilitás, definíciója szerint attól az energiagától függ, amely elválasztja a fehérje feltekeredett állapotát a letekeredett, denaturált állapottól, vagyis a denaturáció folyamatának aktivációs energiájától (E_a). Egy enzim kinetikai stabilitása egy adott hőmérsékleten a denaturáció folyamatának féléletidejével jellemezhető. Az általam vizsgált enzimek esetében a stabilitás jellemzésére jól használható paraméter az optimális működési hőmérséklet (T_{opt}) is, amely szoros korrelációt mutatott a denaturációs hőmérséklettel.

2.2. Termodinamikai stabilitás

A termodinamikai stabilitás, kisebb egy doménes fehérjék esetén, a fehérje feltekeredett és letekeredett állapotának szabadentalpiája közötti különbséggel jellemezhető.



ahol F ("folded") a feltekeredett, U ("unfolded") a reverzibilisen letekeredett állapotot jelöli, k_U és k_F a letekeredés és a feltekeredés folyamatának sebességi állandója. A megfelelő szabadentalpiákat ΔG_F ill. ΔG_U jelölik. Ha feltételezzük a fenti egyszerű kétállapotú modellt a letekeredés folyamatára, valamint azt, hogy nincs jelentős mennyiségű közti termék, reverzibilis a folyamat (a letekeredett fehérje visszaalakulhat natív állapotába), és a résztvevő anyagok végig

egyensúlyban vannak, akkor a termodinamikai számításokat az alább ismertetett egyenletek segítségével tudjuk végrehajtani. Mivel a fenti feltételek az esetek kisebb részében valósulnak meg, legtöbbször a denaturáció, különösen a hődenaturáció irreverzibilis folyamat, ebben az esetben pedig csak korlátozott termodinamikai számításokra van lehetőség.

ΔG_{FU} a reakció szabadentalpia-változása:

$$\Delta G_{FU} = -RT \ln K \quad (2),$$

ahol K a (1) rendszer egyensúlyi állandója.

A standard ΔG_{FU} értékeket általában 25°C-on határozzák meg, denaturálószerekkel indukálva különböző pH értékeken a fehérje letékeredését (Pace és Scholtz, 1997).

Mezofil fehérjékre a ΔG_{FU} értéke (a letékeredés folyamatának szabadentalpia változása) általában a 30-60 kJ/mol tartományba esik. Ez az érték 15-30 hidrogén kötés energiájának a nagyságrendjébe esik, ami kezdetben komoly meglepetést okozott a kutatóknak. Meglepő az is, hogy ez az érték a termofil fehérjék esetében sem feltétlenül haladja meg a mezofil fehérjékre meghatározott értéket. Megállapíthatjuk, hogy a fehérjék, köztük a termofil fehérjék stabilizációs energiáját is, nagy számú, ellentétes erő eredője határozza meg, mely erők abszolút értékéhez képest az eredő stabilizációs energia meglepően kicsi. (Jaenicke és Závodszy, 1990)

Azt a hőmérsékletet, ahol a $K=1$ (a letékeredett és a feltekeredett állapotban lévő fehérjék koncentrációja egyenlő) a fehérje olvadási hőmérsékletének nevezzük (T_m). Ez közelítőleg a kalorimetriás mérések során kapott csúcs maximuma (a gyakorlatban sokszor azonosnak tekintjük a kettőt). Ezen a hőmérsékleten $\Delta G_{FU}=0$. Általában egy fehérje stabilitását ezzel a hőmérséklettel szokták jellemezni.

ΔG_{FU} hőmérsékletfüggésének megállapításához szükséges a letékeredés reakciójának entalpia-változását (ΔH) és a letékeredett és natív állapot közötti hőkapacitás különbséget meghatározni ΔC_p . A kettő között a következő összefüggés állapítható meg:

$$d(\Delta H)/dT = \Delta C_p \quad (3)$$

Gyakorlatban úgy szokták a letekeredés reakciójának entalpia-változását (ΔH) több hőmérsékleten meghatározni, hogy különböző pH-jú oldatokban végzett mérések által meghatározott ΔH_m értékeket ábrázolják a hőmérséklet függvényében, és a (3) egyenlet segítségével a hőkapacitás különbség az egyenes meredekségéből kiszámolható, mivel a különböző pH-n a denaturációs hőmérsékletek különbözőek.

A számoláshoz szükséges értékek meghatározását általában differenciális pásztázó mikroklorimetriával (DSC), vagy CD spektroszkópiával végzik. A DSC mérésekből közvetlen termodinamikai adatokat nyerünk, míg a spektroszkópiai mérések esetén, feltételezve a kétállapotú modellt, a termodinamikai adatok kiszámolhatók. (Privalov és Khechinashvili, 1974)

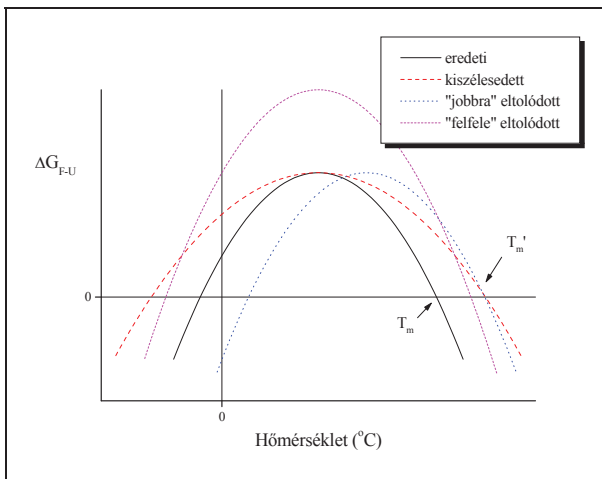
A ΔH_m , ΔC_p és T_m ismeretében a Gibbs-Helmholtz egyenlet (4) felhasználásával ΔG_{FU} hőmérsékletfüggése is kiszámolható:

$$\Delta G_{FU}(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (4),$$

valamint az egyenlet megfelelő átrendezésével a

$$\Delta G_{FU}(T) = \Delta H_m - T\Delta S_m - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (5)$$

egyenletet kapjuk. A $\Delta G_{FU}(T)$ függvény sematikus ábrázolása négy különböző esetre, a 2.1. ábrán látható. A $\Delta G_{FU}(T)$ görbe két pontban metszi a $\Delta G_{FU}=0$ tengelyt, ami azt jelzi, hogy egy adott fehérje letekeredése két hőmérsékleten történhet meg, egy alacsony (hideg denaturáció) és egy magasabb hőmérsékleten (hődenaturáció).



2.1. ábra Stabilizációs stratégiák

Az ábrán látható, hogy egy fehérjemolekula olvadási hőmérsékletének emelésére, vagyis a $\Delta G_{FU}=0$ tengelymetszet eltolására, elméletileg három módszer képzelhető el: az "eredeti" fehérje hőstabilitásának növekedése a görbe kiszélesedésével vagy a görbe "jobbra" tolódásával vagy a görbe "feléle" tolódásával képzelhető el, illetve ezek tetszőleges kombinációja is az ábrán látható módon a T_m érték növekedésével jár együtt. A természetben (a szakirodalomban leírt példák alapján) mindegyik esetre és ezek kombinációjára is találunk példát.

2.3. Kinetikai stabilitás

A laboratóriumi gyakorlatban a legtöbb mezofil, termofil és hipertermofil fehérje letekeredése irreverzibilis folyamat, aminek elsődleges oka az, hogy a denaturáció során felszínre kerülő hidrofób mag elősegíti a fehérjemolekulák irreverzibilis aggregációját. Ezért a korábban tárgyalt egyensúlyi termodinamikai megfontolások nem alkalmazhatók a folyamatok leírására.

Az (1) egyenlet helyett a jelenség a következő reakcióegyenlettel írható le:



Ahol D az irreverzibilisen letekeredett (aggregálódott) állapot jele, k_F , k_U , k_D pedig a megfelelő folyamatok sebességi állandója. Ezek általában nem meghatározhatók, csak eredőjük a látszólagos sebességi állandó mérhető:

$$k_{\text{látsz}} = (k_U k_D) / (k_F + k_D) \quad (7)$$

amely a féleletidővel a következő kapcsolatban áll:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{látsz}} \quad (8)$$

Egy adott hőmérsékleten meghatározott $t_{1/2}$ érték szintén a stabilitás mértékének tekinthető (kinetikailag), és a $t_{1/2}$ értékben bekövetkező változásokat a (kinetikai) stabilitás változásának foghatjuk fel. Egy másik mennyiség, amely egy fehérje stabilitását leírja irreverzibilis letekeredés esetén, a $T_{1/2}$ hőmérséklet, amely nem tévesztendő össze az olvadási hőmérséklettel. Ez az a hőmérséklet, amelyen egy adott inkubációs idő alatt a fehérje 50%-a irreverzibilisen denaturálódik.

Megjegyzendő, hogy magas hőmérsékleten a k_D értéke sokkal nagyobb lehet k_U -nál, és ebben az esetben $k_{\text{látsz}}$ nagyjából megegyezik k_U -val (lásd 7. egyenlet). Ezen megfontolás alapján egy fehérje magas hőmérséklethez történő adaptációjában különösen fontos lehet a kinetikai stabilitás növelése (k_U csökkentése). A szakirodalomban kevés olyan példa található, ahol a kinetikai paramétereket, sebességi állandókat meg lehetett határozni, ezek azonban azt mutatták, hogy a magas hőmérséklethez történő adaptáció a reverzibilis letekeredés sebességi állandójának csökkenésével jár együtt (Plaza és mtsai, 2000).

2.4. Termofil enzimek tulajdonságai

Általában az izolált termofil enzimek hőstabilitása hasonló annak a szervezetnek a hőstabilitásához, amelyből származik (Vieille és mtsai, 1996, Sunna és mtsai, 1997). További jellemző, hogy az extracelluláris illetve sejtfelszíni enzimek olvadási hőmérséklete meghaladja (néha jelentősen) a gazdaszervezet optimális növekedési hőmérsékletét, míg az intracelluláris enzimek olvadási hőmérséklete a gazdaszervezet optimális növekedési hőmérsékletének közelében található. Ismerünk azonban olyan enzimeket is, amelyek denaturációs hőmérséklete alacsonyabb a gazdaszervezet optimális növekedési hőmérsékleténél (Fujiwara és mtsai, 1996). A termofil, hipertermofil enzimek magas stabilitása legtöbbször az enzim belső sajátága, amely külső tényezőktől független, de vannak olyan enzimek is, amelyek magas stabilitásukat külső faktorok segítségével érik el. Ilyen stabilizáló tényező lehet a magasabb só vagy fehérje koncentráció, egyes kofaktorok, szubsztrátok, továbbá szerves molekulák, mint pl. poliaminok jelenléte. Számos ilyen stabilizáló tényezőt leírtak a szakirodalomban (Fabry és Hensel, 1987; Shima és mtsai, 1998; Timasheff, 1993).

2.5. Fehérje adatbázisok elemzése, szerkezeti elemek szerepe a stabilitásban

Mezofil fehérjék szerkezetével összehasonlítva, a termofil enzimek megnövekedett stabilitásáért látszólag csekély szerkezeti különbségek tehetők felelőssé (Jaenicke és Závodszy, 1990). Melyek lehetnek azok a szerkezeti tényezők, amelyeknek jelentős szerepe van a hőstabilitás kialakításában? Az elmúlt évtized kutatásai alapján elsősorban az ionpárok (Szilágyi és Závodszy, 1995 és 2000; Kumar és mtsai, 2000) és a hidrofób mag (Maes és mtsai, 1999, Delboni és mtsai, 1995) szerepe merült fel. Emellett számos más tényezőt is azonosítottak: köztük a hidrogén hidak (Shirley és mtsai, 1992; Tanner és mtsai, 1996), a diszulfidhíd kötések szerepe (Matsumura és mtsai, 1989, Wakarchuk és mtsai, 1994), az üregek számának csökkenése (Eriksson és mtsai, 1992), a hurok régiók rövidülése (Thompson és mtsai, 1999), és még számos más faktor (Querol és mtsai, 1996). A 2.1. táblázatban összefoglaltam a felmerült és vizsgált

lehetséges stabilizáló szerkezeti faktorokat. Ahol a statisztikai vizsgálatok igazolták az összefüggést a hőstabilitással, ott ezt ”+” jelzi, ahol nem volt szignifikáns az összefüggés csak egyedi esetek alapján valószínűsítették a szerkezeti tényező szerepét, ott ezt ”0”-val jelöltem.

szerkezeti tényező	statisztikai vizsgálatok által bizonyított korreláció a hőstabilitással
ionpárok számának növekedése	+
hidrogénkötések számának növekedése	0
a fehérje belső magjának hidrofóbicitás növekedése	+
belső üregek számának csökkenése	+
hőlabilis aminosavak számának csökkenése a szerkezetben	+
másodlagos szerkezet térnyerése a rendezetlen régiók rovására	0
hidrofób felszínek csökkenése	0
alegységek közötti kölcsönhatások erősödése	+
kompaktság (a fehérjét alkotó atomok ”sűrűségének”) növekedése	0
hurok régiók, és maga a polipeptid lánc rövidülése	+

2.1. táblázat Néhány szerkezeti elem megfigyelt összefüggése a termikus stabilitással

A statisztikai vizsgálatok alapján felsorolt tényezők legtöbbször nem lehetett kimutatni a korrelációját a hőstabilitással, és egyúttal nehéz általános megállapításokat tenni a sokszor egymásnak ellentmondó eredmények miatt, amelyek egyik alapvető oka, hogy az egyes fehérje családok egyedi stratégiát alkalmaznak a külső körülményekhez történő adaptációban.

Szilágyi és Závodszy átfogó statisztikai elemzése (Szilágyi és Závodszy, 2000) több szerkezeti elem összefüggését vizsgálta a hőstabilitással, de egyértelmű, szignifikáns összefüggést csak a hőstabilitás és az ionpárok számának növekedése, valamint az üregek számának csökkenése között talált (2.2. táblázat).

Tulajdonság		Korreláció a hőmérséklettel	Változás termofil fehérjékben	Változás hipertermofil fehérjékben
Üregek	<i>száma</i>	↓↓	0	↓↓↓
	<i>térfogaat</i>	↓	↑	↓
	<i>felülete</i>	↓	↑	↓↓
Hidrogén- kötés	<i>szám</i>	0	0	0
	<i>párosítatlan</i>	↓	↓	↓
Ionpárok	<i><4.0 Å</i>	↑↑	↑	↑↑↑
	<i><6.0 Å</i>	↑↑	↑↑	↑↑↑
	<i><8.0 Å</i>	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Másodlagos szerkezet	<i>α</i>	0	↑	0
	<i>β</i>	↑	0	↑↑
	<i>rendezetlen</i>	↓	↓	↓
Felület polaritása	<i>felszíni</i>	↓↓	↑↑↑	0
	<i>eltetett</i>	0	↑	↑

2.2. táblázat Összefüggés a hőmérséklet és az egyes szerkezeti tényezők között (Szilágyi és Závodszky, 2000)

Egy másik átfogó elemzés (Kumar és mtsai, 2000) néhány tényező, mint például a hidrogénkötések jelentősége mellett, szintén rávilágított az elektrosztatikus kölcsönhatás fontosságára. Az elemzés az alegységekből felépülő fehérjékre is kiterjedt, és körükben is megállapította az alegységek közötti ionhálózatok jelentőségét. Bár egyre több bizonyíték szól az elektrosztatikus kölcsönhatás fontossága mellett (Spector és mtsai, 2000), az is egyértelmű, hogy mégsem minden fehérje ezt az eszközt használja stabilitása növelése végett.

Az elmúlt években megjelent publikációk is megerősítik az ionos kölcsönhatás szerepét (Robinson-Rechavi és mtsai, 2006), és emellett kiemelik a szerkezet kompaktságának és a kontaktusrendnek a fontosságát (Ihsanawati és mtsai, 2005, Robinson-Rechavi és mtsai, 2005).

Néhány publikáció a kevésbé vizsgált, szekvenciálisan távoli peptid szegmensek közötti kovalens keresztkötések (Xie és mtsai, 2006, Xiong és mtsai, 2004) illetve az erősebb nem

kovalens kölcsönhatások (Merz és mtsai, 1999, Macedo-Ribeiro és mtsai, 1996) szerepére világított rá. A két szekvenciálisan távoli peptid szegmens között ily módon kialakuló kölcsönhatások a fehérjék konformációs stabilitását növelik, de különböző mechanizmusok révén. A kovalens keresztkötések a letekeredett állapot entrópiáját csökkentik, arányosan a két összekötött aminosav közötti aminosavak számának logaritmusával (Matsumura és mtsai, 1989), míg a szekvenciálisan távoli aminosavak közötti nem kovalens kölcsönhatások a letekeredés aktiválási energiáját növelhetik, amennyiben a kölcsönhatásban résztvevő szegmensek disszociációja a sebességmeghatározó lépés a letekeredés során. Régóta ismert, hogy az egy doménes fehérjék láncvégei a térben közel helyezkednek el egymáshoz. A láncvégek közötti hosszútávú kölcsönhatások kölcsönösen erősítik a rövid- és középtávú kölcsönhatásokat, így segítve egy stabilis globuláris szerkezet kialakulását, amely ellenálló lesz a teljes letekeredéssel szemben (Thornton és Sibanda, 1983).

Egyértelmű választ egyelőre nem tudunk adni arra a kérdésre, hogy mely szerkezeti tényezők játszanak szerepet a hőstabilitás kialakulásában, valószínű, hogy nincs olyan szerkezeti elem, amely kiemelhető lenne mint egyedüli meghatározó tényező. Különböző fehérjék, más-más stratégiát követve, változatos módon képesek adaptálódni a különböző környezeti viszonyokhoz, de vannak olyan stabilizációs faktorok, amelyeket előszeretettel alkalmaz a természet (Jaenicke és Bohm, 1998, Szilágyi és Závodszky, 2000).

2.6. Mezofil és (hiper)termofil enzimek filogenetikai összehasonlítása

Különböző fajokból származó termofil és mezofil enzim párok összehasonlítása értékes ismeretekkel szolgál a hőstabilitás jelenségének megértéséhez. Filogenetikailag közeli fajok ortológ enzimjei általában nagyon hasonló szerkezetűek, a háromdimenziós szerkezet jó közelítéssel egymásra illeszthető. A különbség az enzimek stabilitásában, optimális működési hőmérséklettartományában jelentkezik, illetve az ezért felelős megváltozott lokális kölcsönhatásokban.

Számos termofil mikroorganizmusból származó gént klónoztak és sikeresen kifejeztek mezofil szervezetekben az eltérő kodon használat és transzkripció mechanizmus ellenére, valamint mezofil enzim termofil szervezetben történő expressziójára is van példa. Általában az eltérő hőmérsékleten feltekeredő fehérje stabilitása az eredeti organizmusból származó, izolált fehérjével megegyező maradt, vagy ahhoz közeli értéket mutatott. Ez azt bizonyítja, hogy a hőstabilitás a fehérjék saját, aminosav szekvencia által meghatározott tulajdonsága, amely független az expresszió körülményeitől. Meg kell említeni azonban azt is, hogy a megfelelő poszttranszlációs modifikációk vagy külső faktorok (poliaminok, specifikus dajkafehérjék stb.) hiányában képződhet inaktív, illetve megváltozott stabilitású fehérje, ez azonban nem mond ellent a fenti állításnak.

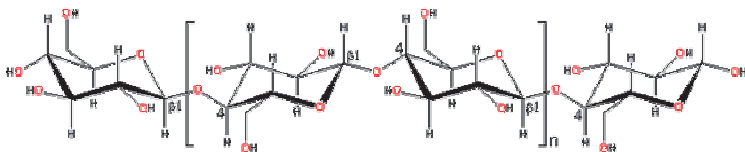
2.7. Modell enzimek: cellulázok és xilánázok

A fehérjék hőstabilitásának vizsgálata során több modellenzimet használtam. A választásom két ok miatt esett ezekre a fehérjékre. Egyrészt mindhárom fehérje gyakorlati szempontból is fontos fehérje, másrészt a vizsgált enzimek az egyik leggyakrabban előforduló, $(\beta/\alpha)_8$ -hordó folddal rendelkeznek (Nagano és mtsai, 2002), így a kísérletekből származó eredmények a fehérjék egy nagyobb csoportjára válnak alkalmazhatóvá. A TIM-hordó foldként is ismert szerkezetet a trióz-foszfát-izomeráz enzim (Banner és mtsai, 1975) vizsgálata során fedezték fel. A narbonin (Hennig és mtsai, 1995) és a konkavalin B (Hennig és mtsai, 1995)

kivételével a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó folddal rendelkező fehérjék enzimek. Az Enzyme Commission által definiált hat enzim családból ötben találhatóak ilyen szerkezetű fehérjék: oxidoreduktázok, transzferázok, liázok, hidrolázok és izomerázok (Nagano és mtsai, 2002). A hidrolázok (különösképpen a glikozidázok) a domináns osztály, amely magában foglalja a TIM-hordó folddal rendelkező enzimek felét.

Az egyik általam vizsgált enzim a termofil *Clostridium thermocellum* baktériumból származó celluláz C (CtCelC), amely nem csak elméleti, de a többi modell enzimhez hasonlóan jelentős ipari alkalmazási potenciállal is rendelkezik. A másik általam tanulmányozott modell rendszert a hipertermofil *Thermotoga maritima* eubaktériumból származó xilanáz B (TmxB) és a xilanáz A enzim katalitikus doménje (TmxAcet) alkotja, amelyek beható vizsgálata az elmúlt bő évtizedben kezdődött Winterhalter és munkatársai által (Winterhalter és mtsai, 1995). A kiválasztott enzimek nagyfokú hasonlóságuk, ugyanakkor eltérő stabilitásuk következtében kiváló modellek a hőstabilitás jelenségének vizsgálatához.

A cellulóz az egyik leggyakoribb, legnagyobb mennyiségben előforduló poliszacharid a Földön, egyben a legnagyobb mennyiségben jelen lévő nem fosszilis, megújuló szénforrás (2.2. ábra), míg a xilán a második legnagyobb mennyiségben előforduló poliszacharid, a hemicellulóz fő alkotórésze. Ipari, környezetvédelmi szempontból mindkettő ígéretes energiaforrás, ezért régóta a kutatás előterébe kerültek a cellulóz és xilán bontó enzimek, a cellulázok és a xilanázok, mint egy környezetbarát technológia elemei. A celluláz és xilanáz enzimek azonban nem csak az energiaiparban játszhatnak fontos szerepet, hanem élelmiszeripari, mezőgazdasági, textilipari felhasználásuk is felmerült, sőt az alkalmazásukra is van már számos példa.



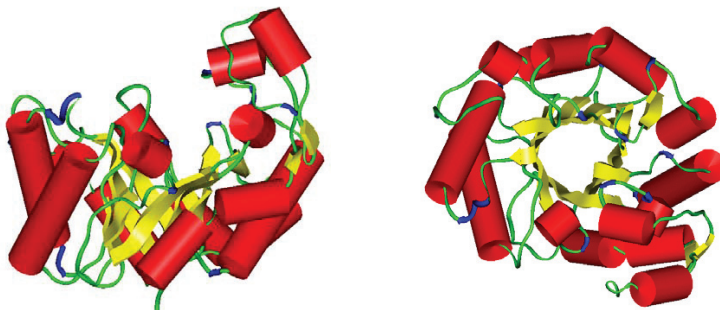
2.2. ábra A cellulóz szerkezete

Szerkezetét tekintve a cellulóz és a xilanáz egy lineáris polimer, mely β -1,4-glikozidos kötéssel kapcsolódó β -D-glükóz illetve β -D-xilóz egységekből áll. A szomszédos cukor molekulák 180° -os orientáltságúak. A hidrogén-híd segít minden glikozidos kötésnél a cukor molekula rideg, merev szerkezetének fenntartásában és az oldhatatlanság előidézésében. A cellulóz rostok igen ellenálló kristályos struktúrája úgy alakul ki, hogy a szomszédos láncok hidrogénkötések és van der Waal's-féle erők segítségével kapcsolódnak össze, és az így kialakuló párhuzamos soroknak az enzimatis lebonatása legalább háromféle különbözö enzimet igényel. A lebonatás nehézségéhez hozzájárul az is, hogy a növények által előállított poliszacharidok legtöbbször nem homogén állapotban fordulnak elő, hanem számos szerkezeti variációjuk megtalálható. A szintén igen gyakori hemicellulóz például a cellulózzal ellentétben amorf szerkezetű, és kémialag is változatosan, D-xilán, D-mannán, D-galaktán és még számos más monomerből épül fel, összetétele a növénytől függ. Abban azonban hasonlít a cellulózhoz, hogy lebonatásában szintén számos különbözö enzim vesz részt (pl. β -xilanáz, β -mannanáz, α -galaktozidáz, β -glükózidáz stb.).

A poliszacharid bontó enzimeket (glikozid-hidrolázok) kétféleképpen csoportosíthatjuk: a klasszikus csoportosítás a szubsztrát specifikitás alapján történik (EC osztályok), de az a tény hogy egy-egy enzim több szubsztráton is mutat aktivitást, nem teszi lehetővé az egyértelmű besorolást. Ezért a 90-es években Henrissat és munkatársai kidolgoztak egy újabb csoportosítást, ami a fehérjék szekvenciájának hasonlóságán alapulva, hidrofób klaszter analízis segítségével

csoportosítja a poliszacharid bontó enzimeket (Henrissat és Bairoch, 1993). Ma már több mint 110 családot különböztetünk meg, és egy családon belül jellemzően többféle szubsztrát specificitású enzim is előfordul (Coutinho és mtsai, 1999). Az általam vizsgált celluláz C a csoportosítás 5. számú, míg a xilanáz enzimek a 10. számú családjába tartoznak.

A *Clostridium thermocellum* egy mérsékelten termofil baktérium, amely számos celluláz bontó enzimmal rendelkezik, sőt egy speciális úgynevezett celluloszómát is képez, amely a sejt felszínéhez kapcsolódva vesz részt a poliszacharidok lebontásában. Legtöbb poliszacharid lebontó enzimje egy speciális szekvencia szakasz segítségével a celluloszómához kötődik, és így fejtik ki hatásukat (Tokaditis és mtsai, 1993). A sejt környezetébe kibocsátott, szabad celluláz enzimje kevés van, a celluláz C ezek közé tartozik (Schwarz és mtsai, 1988, Petre és mtsai, 1986).



2.3. ábra A *Clostridium thermocellum* celluláz C szerkezete több nézetben

A 343 aminosavból felépülő celluláz C röntgendiffrakciós szerkezete ismert (Dominguez és mtsai, 1994 és 1995), amely $(\beta/\alpha)_8$ -hordó, 8 alfa-hélix és 8 béta lemez váltakozó egymásutánjából épül fel (2.3. ábra), ehhez kapcsolódik még egy kisebb, 4 rövid hélixből és 2 béta lemezből, mintegy 54 aminosavból felépülő aldódomén, amely a 6. alfa hélix és 6. béta lemez közé van beágyazva. Szerepe valószínűleg az aktivitásban, szubsztrát specificitásában van.

Az általam klónozott és expresszált egy doménes xilanáz B enzim és az öt doménes

xilanáz A enzim katalitikus doménje a *Thermotoga maritima* tengerfenéki, vulkanikus területekről izolált hipertermofil baktériumból származik. A *Thermotoga maritima*, a vizsgálatok alapján több különböző növényi poliszacharidot képes életfolyamataihoz felhasználni, ami általában nem jellemző a hipertermofil mikroorganizmusokra, emiatt azonban kiváló forrása hipertermofil poliszacharid bontó enzimeknek (Bronenmeyer és mtsai, 1995; Davis és mtsai 1995; Parker és mtsai, 2001). Teljes genomszekvenciája ismert (Nelson és mtsai, 1999), amely két xilanáz enzim jelenlétét mutatja. Mindkét enzimet teljes formájukban már klónoztak és expresszáltak *E. coli*-ban (Winterhalter és mtsai, 1995, Zhengqiang és mtsai, 2001, Ihsanawati és mtsai, 2005)). A xilanáz B enzim röntgendiffrakciós szerkezete ismert (Ihsanawati és mtsai, 2005). A xilanáz A enzim katalitikus doménját az általam meghatározott láncvégekkel még nem állították elő.

3. Célkitűzések

A fehérjék hőstabilitásának problémája évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat, és bár számos tényezőt sikerült azonosítani, amelyek szerepet játszanak a hőstabilitásban, messze vagyunk még attól a ponttól, hogy tervezett módon, tetszés szerint tudjuk változtatni egy adott fehérje stabilitását. Az előző fejezetben a fehérjék hőstabilitásával kapcsolatban említett elméletek különbségei, az egymásnak sokszor ellentmondó megállapítások egyértelművé teszik a kísérleti megközelítés fontosságát. Az azonban már ma is megállapítható a megfigyelésekből, hogy a különböző stabilizáló effektusok enzimenként eltérő mértékben járulnak hozzá a hőstabilitáshoz, és az egyes fehérjecsaládok valószínűleg más-más stratégiát követve növelik stabilitásukat. A természetben előforduló, különböző hőstabilitással rendelkező homológ enzimpárok összehasonlításával olyan információkhoz juthatunk a fehérjék stabilitásának szerkezeti okaira vonatkozólag, amelyek megtaníthatnak bennünket, hogyan növeljük egy számunkra fontos enzim stabilitását.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai elsősorban a mezofil és termofil enzimek hőstabilitása közötti különbség szerkezeti hátterére fókuszáltak és az eredmények alapján az ionpárok, ionhálózatok fontos szerepét valószínűsítettük, amely azóta egyre kevésbé vitatott kérdés. Mivel az elektrosztatikus kölcsönhatáson túl más tényezők is szerepet játszanak a hőstabilitás kialakulásában, ezért kutatásaim során a hőstabilitás kérdéskörét más úton közelítettem meg.

Kutatásom célja az volt, hogy kísérleti munkával, oligonukleotiddal irányított mutagenézissel és a random módszernek tekinthető, racionális family shufflinggal fényt derítsek olyan szerkezeti tényezőkre és tervezési stratégiákra, amelyek segítségével a fehérjék egy nagyobb csoportja, a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó enzimek hőstabilitása, optimális működési hőmérséklete tervezhetővé válik.

A termofil celluláz C esetében még a racionális tervezésen alapuló hőstabilitás növelését tűztem ki célul. Úgy próbáltam meg a stabilitás növelését, hogy nem állt rendelkezésünkre egy nagyobb stabilitású homológ, csak általános ismereteink voltak arról, mely szerkezeti tényezők

stabilizálhatják a fehérjét. Így a mutációk sikere sokkal bizonytalanabb. Munkám célja az volt, hogy egy láncvégek közötti kovalens keresztkötés előállításával, a letekeredett állapot entrópiáját csökkentve, a fehérje konformációs stabilitását megnöveljem.

A munka folyamata a következő volt:

1. Számítógépes modellezés alapján tervezett mutáció kialakítása
2. A mutáns enzim karakterizálása, hődenaturációjának vizsgálata.

A két xilanáz enzimből álló modellrendszert a kevésbé tanulmányozott termofil és hipertermofil fehérjék közötti hőstabilitás különbség hátterének felderítésére alkottam meg. A racionális tervezésen alapuló megközelítésen is változtattam. A cél az volt, hogy az irányított evolúciós technikák közé tartozó „family shuffling” módszert racionalizálva, kiméra enzimeket állítok elő, amelyeket fizikai-kémiai módszerekkel jellemez, és a megnövekedett hőstabilitásért felelős tényezőket a homológia modellezés segítségével felépített szerkezetek alapján azonosítom. Emellett célom volt, hogy a cellulózfehérítés területén kiemelt érdeklődés által övezett xilanázokat felhasználva olyan optimális működési hőmérsékeltű kiméra enzimeket állítsak elő, amelyek a technológiai folyamat hőmérséklet tartományába (80-90 °C) esnek.

A legtöbb, enzimeket használó technológiai lépésnél feltétel, hogy az enzim nagy stabilitású, hosszú féléletidejű legyen, optimális működési hőmérséklete lehetőleg a technológiai folyamat hőmérséklet tartományába essen. Az enzimeket használó ipari technológiák legnagyobb hátránya ma még, hogy bár környezetvédelmileg sokkal előnyösebbek a hagyományos módszereknél, a költség-haszon tekintetében nem állják meg a versenyt. A gazdaságosság növelésének egyik hatékony módszere, ha a génszűrés, fehérjemérnökség eszközeivel, olyan nagyobb hatékonyságú enzimeket állítunk elő, amelyek javítják a módszer gazdaságosságát.

A celluláz és xilanáz enzimeken végzett kísérletek a fenti megfontolás alapján, az alaputatáson túl a lehetséges alkalmazás reményében is történtek. Célom volt a celluláz C enzim stabilitásának növelése és olyan optimalizált működési hőmérsékeltű xilanáz kiméra enzimek előállítása, amelyek ipari felhasználásra is alkalmasak lehetnek.

4. Anyagok és módszerek

Kísérleteim során különböző extrémofil mikroorganizmusok fehérjéinek vizsgálatát végeztem. A fehérjéket nem izolálással, hanem *Escherichia coli* baktériumban történő úgynevezett heterológ expresszióval állítottam elő. A tisztított fehérjék minden tulajdonságukban megegyeztek a hagyományos eljárással izolált enzimekkel. Doktori dolgozatomban bemutatott kísérletek elvégzésének éveitől a molekuláris biokémiai technikák gyors fejlődése következtében számos új módszert ismertem meg, újabb és újabb baktériumtörzseket, plazmidokat és különböző kitéteket használtam. Mivel ezek nem kapcsolódnak dolgozatom lényegi megállapításaihoz, és alapvetően a vizsgálni kívánt fehérjemolekula minél gyorsabb, kényelmesebb és tisztább előállítását szolgálják, csak az általam használt legújabb módszereket mutatom be ebben a fejezetben. Számos ma már rutin módszernek számító, és szakemberek által közismert technika (például: PCR, DNS szekvenálás, SDS-PAGE stb.) megvalósításának részleteire sem térek ki, leírom azonban a dolgozat következtetéseéhez közvetlenül felhasznált módszereket.

4.1. Vegyszerek, anyagok

A kísérletekben használt vegyszerek a Sigma, Merck és Reanal cégek termékei voltak. Az oligonukleotid primereket a Csertex Kft.-től és az MTA SzBK Nukleinsav Szintézis Laboratóriumától rendeltem, a használt plazmidokat a Novagen és a Stratagene cégtől szereztem be. A használt restriktációs endonukleáz, polimeráz, ligáz enzimek a Fermentas, a New England Biolabs és a BD Biosciences cégek termékei voltak.

4.2. Baktériumtörzsek

Vizsgálataimban *Escherichia coli* baktérium különböző törzseit használtam a molekuláris biokémiai műveletek és a fehérje expresszió során. A klónozási, szubklónozási műveletekhez *E. coli* 71-18 törzset, az irányított mutagenézis módszerhez *E. coli* CJ236, JM109 törzseket

használtam. Fehérje expresszióhoz legjobban az *E. coli* BL21(DE3)plysS illetve az *E. coli* BL21(DE3) Codon(+)RIL törzsek váltak be. Az *E. coli* sejteket Luria-Bertani médiumban, 37°C-on növesztettem.

4.3. Expressziós rendszerek

Az általam vizsgált enzimek termelése rekombináns technikával, *Escherichia coli* baktériumban történt. Az expressziós vektorokat a kívánt célnak megfelelően választottam ki: a DNS munkákhoz pBluescriptII SK vektort használtam (Stratagene), amely alkalmas irányított mutagenézis kísérletek megvalósítására, valamint egyéb, a rekombináns technikákkal járó feladatok elvégzésére. A vektor egy nagy kópiaszámú plazmid, melyből egyesszálú DNS is preparálható az irányított mutagenézishez. A vektor tartalmazza a *lac* promótert, valamint a T7 és T3 promóter régiókat, amelyek segítségével a beillesztett gén átírása jó hatékonysággal megoldható. Gazdatörzsként *E. coli* JM109 sejteket, az irányított mutagenézis kísérletekben pedig az *E. coli* CJ236 (*du⁺*, *ung⁻*) sejteket használtam.

A racionális family shuffling módszer alkalmazásánál a kiméra xilanázokat kódoló plazmidok előállításához *E. coli* 71-18 sejtvonalat használtam. A PCR segítségével készített DNS konstrukciókat pET21c vektorba illesztettem.

Az enzimek fizikai-kémiai paramétereinek jellemzéséhez nagy mennyiségű, nagy tisztaságú fehérjére van szükség, ezért ezekhez a kísérletekhez olyan vektort kell használni, amely igen nagy mennyiségben képes a fehérje-expresszióra. A pET vektorcsalád erre a célra kiválóan megfelelt. A pET vektorba helyezett gén a T7 promóter kontrollja alá kerül, így megfelelő *E. coli* törzset használva (*E. coli* BL21(DE3)), amely genomjába illetve tartalmazza a T7 RNS polimeráz gént *lacUV5* promóter kontrollja alatt, igen jó expressziós hatékonyság érhető el megfelelő indukciós körülmények között. A rendszer előnye, hogy az indukciós lépés előtti átírás nagyon alacsony, így a sejtek számára letális fehérjék termelése is megvalósítható, valamint fúziós fehérjék és peptidok kapcsolhatók az expresszálni kívánt enzimhez, ezzel megkönnyítve a fehérje

tisztítását. Az indukció a pET vektor estében is az IPTG molekulával történik. Ahol szükséges volt antibiotikumok jelenléte (ampicillin, klóramfenikol), ott a gyártó utasításai alapján, megfelelő koncentrációban használtam.

4.4. Celluláz és xilanáz enzimek

A *Clostridium thermocellum* celluláz C enzim génje a pET21c típusú expressziós vektorba klónozva állt rendelkezésemre (pETA1). A gén a plazmid *NdeI-HindIII* hasítóhelyére került. A *Thermotoga maritima* xilanáz A katalitikus domén és xilanáz B enzimek génjei (*xynAcat* és *xynB*) nem álltak rendelkezésemre, ezért a *Thermotoga maritima* MSB8 törzs genomjából klónoztam őket (pTM61 1340-2323 bp, pTM70). A *Thermotoga maritima* xilanáz enzimek génjeinek klónozása során izolált *Thermotoga maritima* teljes genomból indultam ki. A TmxAcat fehérje N- és C-terminálisának határait a BLAST program segítségével határoztam meg. A klónozni kívánt génszakaszokhoz megfelelő primereket terveztem (4.1. táblázat) és polimeráz láncreakció (PCR) segítségével megsokszoroztam, majd tisztítottam a DNS-t. Az így előállított DNS-t restrikciós enzimekkel hasítottam (4.1. táblázat) és az expressziós vektor megfelelő hasítóhelyeinél a vektorba ligáltam. A pET21c expressziós vektor az *E. coli* BL21(DE3)pLysS, illetőleg BL21(DE3) Codon(+)RIL sejtvonalakban mindegyik említett fehérje esetében jó kitermelést biztosított.

A gént tartalmazó plazmidot transzformálással, kémiai úton kompetenssé tett *E. coli* sejtekbe jutattam, és a sejtek gyártójának útmutatója alapján IPTG hozzáadásával indukáltam a fehérjeexpressziót. A módszer részletes leírása megtalálható a Novagen cég útmutatójában (pET manual, BL21 manual, Novagen). Kísérleteim során általában nem tértem el a gyártó által javasolt módszertől, illetve ahol eltértem ott ezt jelzem.

primer szekvencia	gén	restrikciós hasítóhely
TCAGGAGGAAACATATGGTGAGTTT	CelC_forw	<i>NdeI</i>
TTTTTTAAATTACAAGCTTTTGCAAAAAT	CelC_rev	<i>HindIII</i>
GCGCATATGATACCTGCTCTGAAAGAAGTACTAAAAGA	TmxAcat-forw	<i>NdeI</i>
GCGGGATCCTCACTCAGGTGCCACTATCGC	TmxAcat-rev	<i>BamHI</i>
GCGCATATGTCTCAGAATGTATCTCTGAGAGAACT	TmxB-forw	<i>NdeI</i>
GCGGGATCCTCATTTTCTTCTTCTATCTTTTCTCC	TmxB-rev	<i>BamHI</i>

4.1. táblázat A celluláz és a xilanáz enzimek klónozásához használt PCR primerek

4.5. Oligonukleotiddal irányított mutagenézis

Az oligonukleotiddal irányított mutagenézist a Kunkel módszer alapján (Kunkel, 1987) végeztem. A mutagenézishez a gént pBluescriptII KS+ vektorba helyeztem át, és ún. "helper fág" segítségével (VCS M13 helper phage) egyes szálú DNS molekulát izoláltam (Molecular Cloning, Sambrook, 2001). Megfelelően megtervezett mutációs primerek segítségével (4.2. táblázat) jó hatásokkal hozhatók létre báziscserék ezzel a módszerrel a fehérjét kódoló génben. Az így kialakuló mutációk meglétét DNS szekvenálással ellenőriztem. A mutációt tartalmazó fehérjék termeltetésére a vad típusú enzimmel egyezően BL21(DE3)pLysS sejtvonalat használtam.

fehérje	szekvencia	mutáció típusa	mutáció
CtCelC	CCTAAATTTATACCACATTTAAAACTCACCA AATCAAGTTTTTCTACACGCCAGTATATT	diszulfidhíd	A6C, R340C

4.2. táblázat A diszulfidhíd kialakításához használt mutagenézis primerek

4.6. Racionális family shuffling

A racionális family shuffling a véletlenszerűségeen alapuló family shuffling racionalizált változata. A modell enzimeként használt xilanázok génjei 55% szekvenciaazonosságot mutatnak, ami túl alacsony az eredeti módszer hatékony működéséhez (Bloom és Benson, 2005), ezért a kiméra géneket úgy alkottam meg, hogy a family shuffling módszert racionalizálva alkalmaztam.

A módszer segítségével, a vad típusú enzimeket kódoló gének megfelelő szegmenseit önépítő PCR reakcióval egybeépítve állítottam elő a kiméra xilanázokat. A két szülői gént összerendezve a SIM-algoritmus (Huang és Miller, 1991, <http://expasy.ch/tools/sim.html>) segítségével, öt nagy azonosságot mutató shuffling helyet találtam. A megfelelő helyek kiválasztásához az azonosságot egy tizenkilenc bázispáros, az összerendezés mentén gördülő ablakban vizsgáltam, és a következő kritériumoknak kellett megfelelni: a tizenkilenc bázispárból a két szekvenciárészlet adott helyén a különböző nukleotidok száma maximum három lehetett, amelyek nem fordulhattak elő az első és utolsó három pozícióban (4.1.ábra). A kritériumoknak megfelelő helyeket lehet használni önépítő helyekként a PCR annelációs hőmérsékletén.

```
TmxAcat 3  GATACCTGCTCTGAAGAAGTA-CTAAAGACT--ACTTCAAAGTCGGAGTTGC
TmxB      9  GAATGTATCTCTGAGAGAACTCGCAGAAAAGCTGAACATCTATATGGTTTTCG
          **          ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * *
54  A-CTGCCGTCCAAGGTCTTCCTCAACCCGA-----AGGACATAGAAGTATCAGGAAACAC
63  CGCAATCAACAACCTTTTGGTCTCTTCCGACGCAGAAAAGTACATGGAAGTTGCAAGAAGAGAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
109 TTCAACAGCATCACCGCTGAAAACGAGATGAAACCAGAGAGCCTGCTCGCGGGCATCGAAAACG
127 TTCAACATCCTGACCCCTGAAAACGAGATGAAG--TGGGATACGATT-----CATCCAGAAAAG
          ***** * * *** ***** ***** * * * * * * * * * * * *
173 GTAAGCTGAAGTTCAGGTTTGAACAGCAGACAAATACATTAGTTCGTCGAGGAAAACGGCAT
183 --AGACAGA--TACAATTTCACTCCCGCTGAAAAACACGTTGAGTTTGCAGAAGAAAACGACAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
237 GGTATAAGAGGTCACACACTGGTGTGGCACAACCAGACACCCGACTGGTTCTCAAAGACGAA
243 GATCGTGCATGGCACACACTTGTCTGGCACAACCAGCTTCCTGGATGGATC--ACTGGTAGAG
          * * * * * ***** ** ***** * * * * * * * * * * * *
301 AACGGAAACCTCCTCTCCAAGAAGCGATGACGGAAGACTCAAAGAGTACATCCACACCGTTG
305 AATGGA-----CAAAGGAAGAACTTTGAACGTTCTTGAAGACCACATAAAAAACGGTGG
          ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```

365 TCGGACACTTCAAAGGAAAAGTCTACGCATGGGACGTGGTGAACGAAGCGGTCGATCCGAACCA
359 TGTCTCATTCAAAGGTAGAGTGAAGATCTGGGATGTGGTGAACGAAGCGGTGAG--CGATTCT
*   ** ***** *   ** *   ***** *****
429 GCCGGATGGACTGAGAAGATCCACCTGGTACCAGATCATGGGCCTGACTACATAGAAGTCCGC
421 G--GAACCTACAGGGAAG--CGTGTGTACAAGACGATCGGTCCTGAATACATTGAAAAAGCG
*   *   *   ** *   ** *   ***** ** *   *   ***** ***** ** *
493 TTCAAGTTCGCAAGAGAAGCAGATCCAGATGCAAAACTCTCTACAACGACTACAACACATTCTG
481 TTCAGATGGGCAAAAGAAGCCGATCCAGATGCGATTCTCATCTACAACGACTACAGCATAGAAG
**** *   **** ***** ***** *   **** ***** ***** ** *   *
557 AGCCCA--GAAAGAGAGATAT-CATCTACAACCTCGTGAAGGATCTCAAGGAGAAGGGA--CT
545 AAATCAACGCAAAATCGAATTCGTCTACAACATGATAAAAGAGCTGAAAGAAAAGGAGTACC
*   ** *   *   *   *   *   ***** *   *   *   *   *   *   ***** *
615 CATCGATGGGATAGGCATGCAGTGTACATCAGTCTTGCAA--CAGACATCAACAGATCGAA
609 TGTGTAGGAATAGGATTTTCAGATGCACAT-AGACTACAGAGGGCTCAATTATGACAGTTTCAG
*   ***** ***** *   ** ***** ** *   *   *   *   ***** *
676 GAGGCCATCAAAAAGTTCAGACCATAACCGGTATAGAAATTCACATCACAGAACTGGATATGA
672 AAGGAATTTGGAGAGATTGCG--AACTCGGTCTTCAAATTTACATCACAGAAATGGATGTGA
**** *   *   *   *   *   *   *   ***** *   ***** ***** ***
740 GTGTCTACAGAGATTCAGTTCCTCAACTACCCAGAGGCACCGAGGACGGCACTC--ATCGAACAG
734 GA-----ATTCTT-----CTCAGTGGTTCGGAGGAGTATTATTGAAAAAACAG
*   ***** *   *   *   *   *   ***** *   *   *****
802 GCTCAGAAAATGATGCAGCTCTTTGAGATTTTCAAGAAGTACAGCAACGTGATCACGAACGTCA
776 GCTGAAGTTTGTGCGAAGATCTTCGATATATGCTTGGACAACCCGTCAGTTAAAGCGA--TCC
*** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
866 CATCTCTGGGGTCTCAAGGACGATTACTCCTGGAGAGCAA-----CAAGAAGAAACGACTGGCC
837 AGTTTGGGGATTACAGACAAATACTCCTGGGTTCGGGCTTTTCAAAGGGTACGGGAAAGC
*   ***** ** *   *   *   ***** *   *   *   *   *   *
924 GCTCATCTTCGACAAAGATCACCAGGCGAAACTCGCTTACTGGGCGATA--GTGGCACCTGAG
901 GTTGCTCTTCGATGAGAATTACAACCCCAAGCCTTGTTATTACGCGATAAAAGAGGTGCTGGAG
*   *   ***** *   *   *   *   *   *   *   *   ***** *   *   *

```

4.1. ábra A TmxAcat és TmxB fehérjék nukleotid szekvenciáinak összerendezése. A kiválasztott shuffling helyeket kövér betűkkel emeltem ki, az azonos nukleotidokat csillaggal jelöltem.

A racionális family shuffling PCR reakciók sorozatából áll össze. Az első PCR reakcióban a két shuffling hely között lévő, kiválasztott szegmenst amplifikáltam. A DNS

denaturációját 98 °C-on 2 percig, az annelációt 57 °C-on 30 másodpercig végeztem, a 68 °C-on lejátszódó szintézis ideje pedig a 30 sec-2 min időtartományban változott, mindez 15-20 ismétlődő ciklussal. A PCR terméket agaróz gélből izoláltam. A megfelelő, tisztított PCR termékeket használtam templátként a primer nélküli önépítő PCR reakcióban. A harmadik PCR reakcióban a nagy azonosságot mutató shuffling helyek mentén már összeépült kiméra géneket amplifikáltam. A PCR reakciók körülményei megegyeztek az első reakcióéval. A kiméra gének előállításához használt primerek DNS szekvenciái a 4.3. táblázatban szerepelnek. A primerek megfelelő kombinációját alkalmazva állítottam elő az egyes kiméra géneket.

Primer	Szekvencia
TmxAcat-segment1-forw (=TmxAcat_forw)	5' GCG CATATG AIA CCT GCT CTG AAA GAA GTA CTA AAA GA 3'
TmxB-segment1-forw (=TmxB_forw)	5' GCG CATATG TCT CAG AAT GTA TCT CTG AGA GAA CT 3'
Segment1-rev	5' TTC ATC TGG TTT TCA GGG GT 3'
Segment2-forw	5' ACC CCT GAA AAC CAG ATG AA 3'
Segment2-rev	5' CTG GTT GTG CCA GAC AAG TGT GTG 3'
Segment3-forw	5' CAC ACA CTT GTC TGG CAC AAC CAG 3'
Segment3-rev	5' ACC TCT TCG TTC ACC ACA TCC CA 3'
Segment4-forw	5' TGG GAT GTG GTG AAC GAA GAG GT 3'
Segment4-rev	5' TGT AGT CGT TGT AGA TGA G 3'
Segment5-forw	5' CTC ATC TAC AAC GAC TAC A 3'
Segment5-rev	5' ATC CAT TTC TGT GAT GTA AAT TT 3'
Segment6-forw	5' AAA TTT ACA TCA CAG AAA TGG AT 3'
TmxAcat-segment6-rev (=TmxAcat_rev)	5' GCG GGATCC TCA CTC AGG TGC CAC TAT CGC 3'
TmxB-segment6-rev (=TmxB_rev)	5' GCG GGATCC TCA TTT TCT TTC TTC TAT CTT TTC TCC 3'

4.3. táblázat A kiméra gének előállításához használt primerek DNS szekvenciái

4.7. Fehérje tisztítás

Az expressziós vektort tartalmazó, az indukció után 3-4 órát növesztett *E. coli* sejteket centrifugálással összegyűjtöttem és egy fagyasztási ciklus után, szonikáló berendezéssel a sejteket feltártam. Egy újabb centrifugálással a sejtörmeléktől elválasztottam a felülúszót és további tisztítási lépéseknek vettem alá:

1. Hődenaturáció (csak termofil fehérjék esetén)
2. Ammónium szulfátos frakcionálás
3. Ioncsere kromatográfia (FPLC)
4. Gélszűrés (FPLC)

Az így tisztított fehérjéket ultraszűréssel a további vizsgálatokhoz megfelelő koncentrációra töményítettem be és fagyasztva, -20°C-on tároltam. Az egyes fehérjéknél alkalmazott részletes tisztítási körülmények megtalálhatók az irodalomjegyzékben megadott hivatkozásokban (Németh 2002, Kamondi 2008).

A racionális family shuffling módszerrel előállított kiméra xilanázok nagy száma miatt egy általánosan használható tisztítási eljárást dolgoztam ki, amelynek segítségével az enzimek biokémiai és biofizikai jellemzéséhez elegendő tisztaságú fehérjeoldatokat kaptam. A tisztítási protokoll a következő lépésekből állt:

1. Hődenaturáció
2. Ammónium szulfátos frakcionálás
3. Ultraszűrés (YM10 és YM50 membránokkal)

4.8. Enzimaktivitás mérése és a fehérjekoncentráció meghatározása

A *Clostridium thermocellum* celluláz C enzim aktivitását 100 mM szukcinát pH=6.0 pufferben mértem, amely a szubsztrátként használt para-nitrofenol-cellobiózt 0.2 mM koncentrációban tartalmazta. Az enzim által katalizált reakció során a cellobióz molekuláról lehasadó kromofór para-nitrofenil csoport 410 nm-en detektálható. Az enzim optimális működési

hőmérséklete, ahol a méréseket is végeztem, 60°C.

A hőinaktivációs mérések a különböző hőmérsékleten inkubált enzim oldatok maradék aktivitásának mérésén alapulnak. A használt enzim koncentráció minden esetben 0,1 mg/ml értékre lett beállítva a megfelelő pufferben, és különböző hőmérsékleten történt 10 perces inkubáció, illetve állandó hőmérsékleten történt változó ideig tartó inkubáció után azonnal mértem a maradék aktivitást a fent leírt módszerekkel.

Az általam klónozott *Thermotoga maritima* xilanázok (TmxAcat, TmxB) és az előállított kimerá enzimek aktivitását a poliszacharid xilán hidrolízisen keresztül mértem. A poliszacharidok lebontását katalizáló enzimreakció sebességét a képződő "redukáló cukor" mennyiségének mérésével állapítottam meg. A méréseket a dinitro-szalicilsav alkalmazásán alapuló módszerrel végeztem (Bernfeld, 1955). A standard esszé (500 µl) 1% zabból származó xilánt tartalmazott A pufferben (15 mM bórsav, 15 mM KH₂PO₄ and 15 mM KH₂PO₄, pH=6.0) és a megfelelően hígított enzimet. Az inkubáció, amennyiben ezt nem jelzem, 10 percig tartott a megfelelő hőmérsékleten, ami után 0.75 ml dinitro-szalicilsavval állítottam le a reakciót. 20 perc 95 °C-on történő színelőhívás után 575 nm-en mértem a redukáló cukor mennyiségét. Az enzim egy egysége (unit) alatt a nemzetközileg elfogadott definíció alapján azon enzimmennyiséget értem, amely szükséges ahhoz, hogy 1 perc alatt 1 µmol xilózzal egyenértékű redukáló csoport képződését katalizálja a reakcióban. A kinetikai paramétereket (k_{cat} és K_m) az optimális működési hőmérsékleteken, az Eadie-Hofstee ábrázolás segítségével határoztam meg három független mérés alapján és öt szubsztrát koncentrációnál.

A doktori dolgozatomban bemutatott aktivitásmérések eredménye minden esetben legalább három mérés átlagaként lett meghatározva. A spektrofotometriás méréseket egy Jasco V-500 típusú kétsugaras készüléken végeztem.

A fehérjekoncentrációt egyrészt a BCA módszerrel, BSA-t használva standardként, másrészt UV abszorbeió 280 nm-en történő mérésével határoztam meg. A megfelelő elméleti moláris extinkciós koefficiens kiszámítására a ProtParam (Gasteiger és mtsai, 2005) alkalmazást

használtam.

4.9. Spektropolarimetria és differenciális pásztázó mikrokalorimetria

A fehérjék letekeredésének (denaturációjának) nyomon követése differenciális pásztázó mikrokalorimetriával (Microcal VP-DSC) és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával (Jasco J-720) történt. A felfűtési sebesség 1 °C/perc és 2 °C/perc volt a celluláz illetve a xilanázok esetében. A mérés előtt a minták egy éjszakán át a mérési pufferben dializálódtak, és referenciaként a dialízis puffert használtam. A DSC mérések során kapott értékek az ezen a területen még gyakran használt cal-ban vannak megadva, 1 cal=4.18 J. A cirkuláris dikroizmus mérések során a felfűtési spektrumokat 221 nm-en, 1 mm-es kvarc küvettában detektáltam (ha nincs másként jelezve). A fehérje oldatok általában 0.1-0.4 mg/ml-re lettek hígítva dialízis után a műszeres mérésekhez.

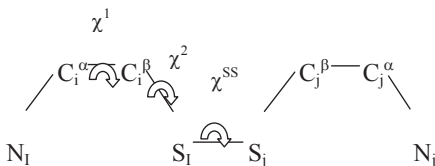
A celluláz C enzimmel végzett kísérletekhez 20 mM Trisz pH=7.2 puffert használtam, míg a xilanázok mérései 45 mM kálium-foszfát (pH=6.0) pufferben történtek. Redukáló körülmények között a DTT koncentrációja 50 vagy 100 mM volt.

4.10. Guanidin-hidroklorid denaturációs mérések

A guanidin-hidroklorid denaturációs mérések a *Clostridium thermocellum* celluláz C és ennek diszulfidhidat tartalmazó mutációjával történtek. A mérések során a fehérjekoncentráció 0.02 mg/ml értékre lett beállítva, a mérések 50 mM Trisz (pH=7.0) pufferben, 0.01 % Tween 20, 3 mM redukált és 3 mM oxidált glutation, valamint guanidin-hidrokloridot változó koncentrációban tartalmazó oldatban, egynapos inkubáció után történtek (Pace, 1988). A fehérje letekeredését, amely majdnem teljesen reverzibilis volt, CD spektroszkópiával követtem nyomon.

4.11. Diszulfidhíd-tervezés, homológiamodellezés, kontaktusenergia-számítás

A celluláz C enzim esetében a diszulfidhidat kialakító mutációk tervezése az SSSEARCH és az SSBOND szoftverekkel (C. R. Martin, University College London) történt. Az SSSEARCH a két aminosav 1-1 β - és 1-1 α -szénatomja közötti távolságot vizsgálja. Diszulfidhíd kialakulását akkor valószínűsíti, ha a β -szénatomok közötti távolság 2.8 és 4.6 Å, az α -szénatomok közötti távolság pedig 3.9 és 8.3 Å közé esik. A program által adott eredményeket vizsgáltuk tovább az SSBOND programmal. Ez a χ^1 és a χ^{SS} torziószögeket (4.2. ábra) vizsgálja, és optimális torziószögek és kötéstávolság esetén ad megoldást.



4.2. ábra A számítógépes tervezésnél vizsgált χ^1 és χ^{SS} torziószög

A fehérjék térszerkezetének meghatározása csupán szekvenciájuk alapján még megoldatlan feladat. A probléma lényege, hogy egy tetszőleges szekvenciához megtaláljuk a polipeptid láncnak azt a konformációját, amely a szabadentalpia függvény globális minimumát adja. A fehérjék térszerkezetének jóslásához felhasználhatók a már megismert térszerkezetek. Ezen eljárások közül az egyik a homológiamodellezés (Greer, 1990 és 1991). A módszer abban az esetben használható, ha a szekvenciánkhoz találunk olyan ismert térszerkezetű fehérjét, amelynek szekvenciaazonossága a jósolni kívántéval nagyobb, mint 20%.

Homológiamodelleket a TmxAcet és három kiméra xilanáz enzimre (BA₄B, BA₅ és A₅B) építettünk, templátként a TmxB röntgen szerkezetét (PDB: 1vbu) használtuk. A szekvencia összerendezéseket a T-Coffee programmal (Notredame és mtsai, 2000), míg a modellépítést a Modeller (Sali és Blundell, 1993) 9.3 verziójával végeztük. A protokoll változó célfüggvény

optimalizációját molekula dimanikai optimalizáció követte. Minden célfehérjére 25 modellt építettünk, amelyből a legalacsonyab függvényértékkel rendelkezőt fogadtuk el végső modellként. A homológiamodellezéssel felépített modellek sohasem tökéletesek, abban azonban biztosak lehetünk, hogy a molekulagerinc lefutása megfelel az adott fehérjecsaládra jellemző mintának, az oldalláncok és a variábilis régiók konformációja azonban kérdéses marad.

A kontaktusenergiák számítását a Miyazawa-Jernigan kontaktusenergia-mátrix (Miyazawa és Jernigan, 1985) segítségével végeztük. Kontaktusnak minősült minden olyan aminosavpár, amelyek oldalláncainak a tömegközéppontja közelebb volt, mint 6.5 Å. A kölcsönhatási energiát két fehérjerégió között az oldalláncok közötti kontaktusenergiák felösszegzésével kaptuk. A kölcsönhatási energiák statisztikai alapon, a Boltzmann-eloszlás alapján definiált effektív kontaktusenergiák, amelyek RT egységekben értendők.

4.12. Egyéb alkalmazott módszerek

A szabad tiolcsoportok (-SH) koncentrációjának meghatározása 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzolsav)-val (DTNB) szobahőmérsékleten történt, ahogy a megadott hivatkozásban részletesen szerepel (Creighton, 1984). A szabad tiol csoportok koncentrációját a felszabaduló 2-nitro-5-benzoát anion koncentrációjából számoltam, 13700 M⁻¹cm⁻¹ moláris extinkciós koefficiens felhasználásával.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1. Mutáns celluláz C enzim tervezése

Az egyik modell enzim, amelynek a hőstabilitását kovalens keresztkötés kialakításával, vagyis a konformációs stabilitás növelésével kívántam növelni, a celluláz C enzim volt. A cellulóz bontó enzimek jelentős gyakorlati felhasználási potenciállal rendelkeznek, amint azt a bevezetőben tárgyaltam. Több összehasonlító vizsgálat foglalkozott a TIM hordó típusú fehérjék szerkezetének és termikus stabilitásának összefüggésével, azonban az 5. családba tartozó cellulázokra vonatkozólag kevés információ állt rendelkezésünkre. Kísérleteim kezdetén nem volt ismert hipertermofil homológ párja az enzimnek, amelynek szekvenciájával vagy szerkezetével összehasonlítva ötleteket meríthettünk volna a stabilizációs stratégiákhoz. Így kutatócsoportunkban az enzim stabilizálására irányuló mutációk tervezése és megvalósítása, ahogy az általam előállított kovalens keresztkötés is, homológ pár nélkül, általános megfontolások és számítógépes modellezés alapján történt.

A diszulfidhíd kialakítását az N- és C-terminális régiók összekötésével terveztem. Számos megfigyelés mutatta a terminális régiók fontos szerepét a letekeredésben, és a diszulfidhidak szerkezetstabilizáló szerepe is régóta ismert, amelyet a letekeredett állapot entrópiájának csökkenésével magyarázhatunk.

5.1.1. Diszulfidhíd kialakítása irányított mutagenézis módszerrel

Az irányított mutagenézissel előállított mutáció egy reményeink szerint diszulfidhíd kialakulásával járó, dupla mutáció beépítése volt a celluláz C molekulába. A diszulfidhidak szerepe a fehérjék szerkezetének stabilizálásában régóta ismert, és több sikeres kísérlet történt fehérjék stabilizálására diszulfidhidak által (Burg és mtsai, 1998; Matsumura és mtsai, 1989; Wakarchuk és mtsai, 1994). A statisztikai vizsgálatok azonban mégsem állapították meg a diszulfidhidak számának növekedését a hipertermofil fehérjék szerkezetében. Ennek oka abban

keresendő, hogy a diszulfid kötés magas hőmérsékleten bomlékonyá válik, és nem tudja stabilizáló szerepét betölteni (Spasov és mtsai, 1994). Mérsékelt termofil hőmérsékleteken azonban még nem okoz problémát ez a jelenség.

A mutációt úgy terveztük meg, hogy a kialakuló diszulfidhíd, minél távolabbi régiókat kössön össze a fehérjében, ugyanis kísérletek kimutatták, hogy a fehérje stabilitása szempontjából annál kedvezőbb a kialakuló kovalens kötés, minél messzebb van szekvenciálisan a résztvevő két cisztein oldallánc. A magyarázat a letekeredett fehérje entrópiájának csökkenésében rejlik, mivel a kovalens diszulfidhíd kötés megmarad a letekeredés során (Pace, 1988b). Az entrópiikus tag értéke, egy empirikusan megállapított formula szerint:

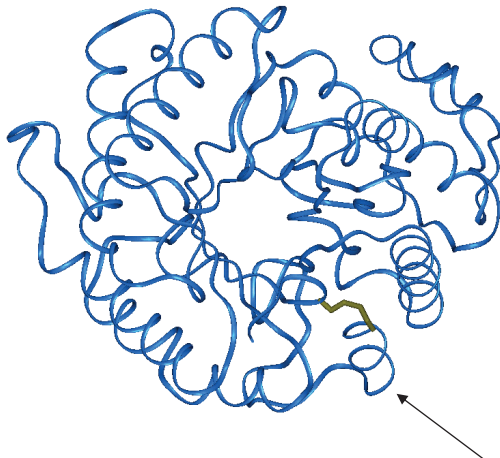
$$\Delta S = -2.1 - 3/2 R \ln n \quad (9)$$

ahol n az aminosavak száma a két cisztein molekula között, R pedig az egyetemes gázállandó.

Egy érdekes megfigyelés szerint globuláris fehérjék esetén az N és C terminális régiók nagyon gyakran közel kerülnek egymáshoz (Thornton, 1983). A celluláz C esetében is ezt tapasztalhatjuk. A kialakított mutációkat a maximális stabilizációs hatás elérése végett, az N- és C-terminális régiók összekapcsolásával terveztük. A terminális régiók szerepe más szempontból is fontos lehet a hőstabilitásban. Megállapítható, hogy a terminális régiók általában sokkal flexibilisebbek, mint a molekula egésze, és nagyon gyakran itt kezdődik meg a fehérje letekeredése. A fehérjemolekula végeinek rögzítésével, csökkenthetjük flexibilitásukat, ezáltal az egész molekulát stabilizálhatjuk.

Diszulfidhidak viszonylag egyszerűen tervezhetők a fehérjék szerkezetébe, néhány egyszerű geometriai kritériumnak kell csupán teljesülnie (Sowdhamini és mtsai, 1989). Munkám során az SSSEARCH és SSBOND programokat használtuk a mutáció tervezéséhez. Az SSSEARCH program a szerkezet ismeretében egy listát készít a lehetséges, beépíthető diszulfidhidakról a geometriai kritériumok alapján, míg az SSBOND program elvégzi a lehetséges diszulfidhidak konformációs analízisét. A lehetséges diszulfidhidak száma 46 volt a celluláz C

esetében, ebből a 6-os alanin és a 340-es arginin cseréje ciszteinre tűnt a legígéretesebb próbálkozásnak. A számítógépes modellezéssel jósolt, valószínű szerkezet az 5.1. ábrán látható.



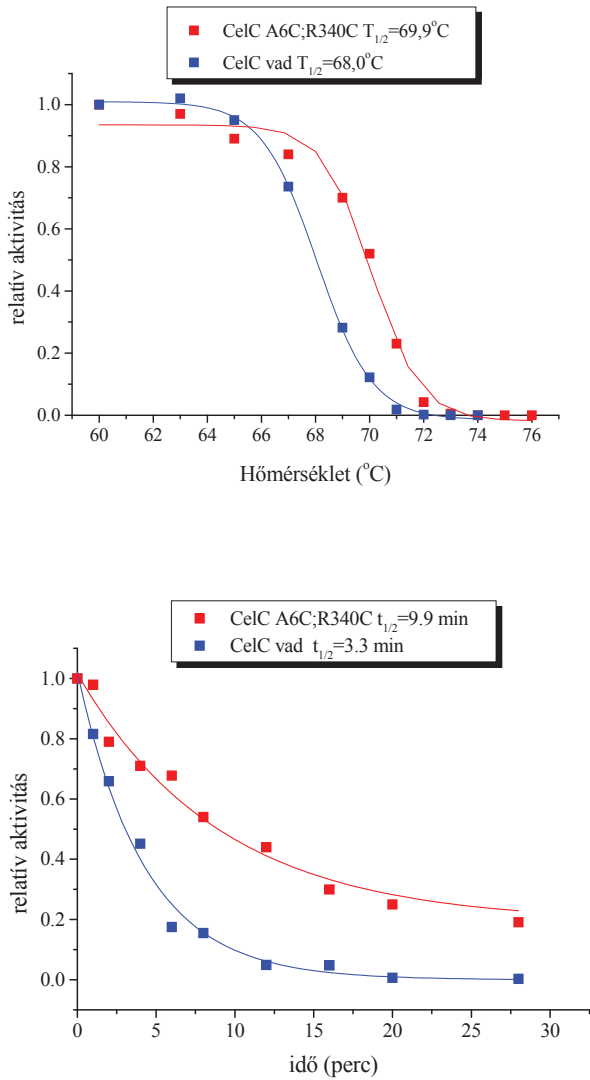
5.1. ábra Az A6C és R340C mutációk hatására megvalósuló diszulfidhíd modellje

A tervezett mutációt létrehozva, a szabad tiolcsoportok koncentrációjának meghatározásával ellenőriztem a diszulfidhíd kialakulását. A mérések a diszulfidhíd létrejöttét mutatták ki.

5.1.2. A mutáns celluláz C enzim hőstabilitásának jellemzése

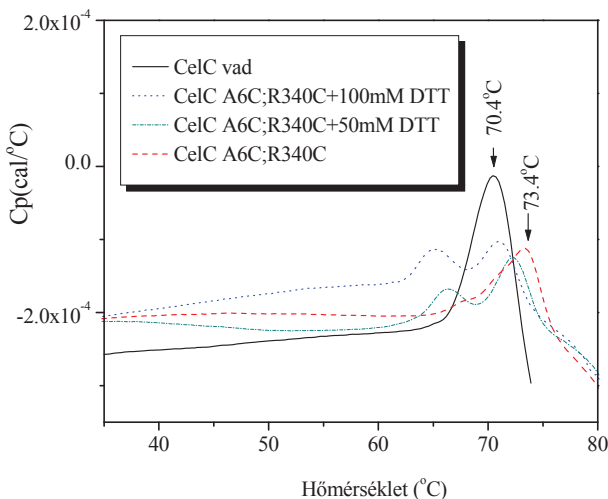
A stabilitásvizsgálatokhoz a korábbi mutációknál bemutatott pásztázó mikroklorimetria, CD spektroszkópia és aktivitásmérésen alapuló hőinaktivációs méréseken túl, guanidin-hidroklorid denaturációs vizsgálatokat végeztem.

A legkönnyebben elvégezhető hőinaktivációs mérések alapján a kialakuló diszulfidhíd mintegy 2°C-kal stabilizálta a fehérjét, és 70°C-on pontosan megháromszorozta a félléletidejét (5.2. ábra).



5.2. ábra. Hőinaktivációs mérések a celluláz C diszulfidhidat tartalmazó mutációján

A műszeres mérések (DSC, CD) megerősítették a hőinaktivációs mérések eredményét, és mintegy 3°C stabilitásnövekedést tapasztaltam. Mivel a hődenaturáció minden esetben irreverzibilis volt, így nem tudtam termodinamikai adatokat számolni a mérések adataiból, csak a látszólagos olvadási hőmérsékleteket határoztam meg (5.3. ábra).



5.3. ábra. Hődenaturációs mérések a celluláz C diszulfidhidat tartalmazó mutációján

Egy érdekes jelenség azonban leolvasható az 5.3. ábráról: ha a diszulfidhidat tartalmazó fehérje oldatához redukálószer adunk, akkor a denaturációs hőmérséklet csökkenni kezd, és megjelenik egy második csúcs a felfűtési görbén, ami valószínűleg a redukált (félciszteineket tartalmazó) fehérjemolekula hatása (50 mM DTT, pH=7.2, 0 perc inkubáció). A vad típusú fehérje esetén hasonló jelenséget nem tapasztaltam redukálószer hatására. Ha a redukálószer mennyiségét és az előinkubációs időt tovább növeljük, a denaturációs hőmérséklet tovább csökken és a csúcsok alatti terület eltolódik az alacsonyabb hőmérsékletnek megfelelő csúcs irányába (100 mM DTT,

pH=7.2, 30 perc inkubáció 60°C-on), de nem sikerült olyan mérést végezni, ahol a magasabb hőmérsékleten észlelt csúcs teljesen eltűnt volna.

A redukált forma denaturációs hőmérséklete mintegy 4°C-kal volt alacsonyabban a vad típushoz képest ($T_m = 66.3^\circ\text{C}$), amit a két pontmutáció által destabilizált szerkezet okozhat. A 6-os alanin cseréje ciszteinre, valamint a 340-es arginin cseréje ciszteinre néhány kedvezőtlen kölcsönhatás kialakulásával járhat, ami destabilizáló hatású lehet. Ugyanakkor a ciszteinek által kialakított kovalens kötés a konformációs stabilitás növekedését eredményezte a stabilizáló entrópiás hatás miatt.

Mivel a hődenaturációs mérések minden esetben irreverzibilisek voltak, guanidin-hidroklorid denaturációs mérésekkel próbáltam a mutáció termodinamikai jellemzését elvégezni. Az egyensúlyi denaturációs mérések segítségével a letékeredés folyamatának szabadentalpia-változása meghatározható (Pace 1988). Az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírt körülmények között a fehérje denaturációja 90%-ban reverzibilis volt. A denaturálószer különböző koncentrációjánál egyensúlyi állapotban mért ellipticitás értékek félértékét meghatározva, a vad és a diszulfidhidat tartalmazó enzim stabilizációs szabadentalpiája meghatározható (Pace, 1988).

A mérések eredményeit az 5.1. táblázatban foglaltam össze. A táblázatban szereplő félérték az a guanidin-hidroklorid koncentráció, amelynél az enzim 50%-a van letékeredett állapotban, a $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ a stabilizációs szabadentalpia vízben, $\Delta(\Delta G)$ ennek változása.

fehérje	félérték (c_{GdmCl}) (M)	$\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G)$ (kcal/mol)
CelC vad típus	2.49	6.30	-
CelC A6C,R340C	2.61	8.03	1.73

5.1. táblázat Guanidin-hidroklorid denaturációs mérések összefoglalása

Az adatok egyértelműen azt bizonyítják, hogy a mért stabilitásnövekedés mögött valódi termodinamikai stabilitásnövekedés van. A számolt stabilizációs szabadentalpia növekedés 1.73 kcal/mol. Az így kapott érték kisebb, mint a (10) egyenlet alapján számított diszulfidhíd hozzájárulása a stabilizációs energiához: 5.8 kcal/mol. A (10) ugyanakkor nem veszi figyelembe, hogy a diszulfidhíd beépítése jelen esetben bizonyos mértékű destabilizációval is együtt jár, ami felelős lehet a különbségért.

5.2. Xilanáz kimérák tervezése

A cellulázokhoz hasonlóan a xilanázok is jelentős ipari potenciállal rendelkeznek. Gyakorlati szempontból is érdekes feladat aktivitási profiljuk optimalizálása az adott technológiai folyamatokra. A xilanázok esetében a termofil és hipertermofil fehérjék hőstabilitásáért felelős szerkezeti tényezőiben lévő különbségekre próbáltam fényt deríteni. A vizsgálatot alapvetően véletlenszerű módszer segítségével végeztem, előbb előállítottam több kiméra enzimet, majd jellemeztem azokat, és az ígéretesnek tűnő fehérjék szerkezeteit az épített homológia modellek segítségével elemeztem.

5.2.1. Kiméra xilanázok előállítása racionális family shuffling módszerrel

A TmxB és TmxAcet enzimeket kódoló géneket a *Thermotoga maritima* eubaktérium genomjából klónoztam és szekvenálással ellenőriztem. A gének nukleotid szekvenciáinak hasonlóságát a 4.1. ábra szemlélteti. Az *Anyagok és módszerek* fejezetben ismertetett shuffling hely kiválasztással öt rövid DNS-szakaszt azonosítottunk, amelyek mindkét vad típusú fehérjét hat szegmensre osztják (TmxB: B1-B2-B3-B4-B5-B6; TmxAcet: A1-A2-A3-A4-A5-A6). A hatvankét lehetséges kimérából ($2^6=64$, és ebből levonandó a két vad típusú enzim) PCR segítségével húsz konstrukciót állítottam elő a megfelelő szegmensek kicserélésével (5.2. táblázat).

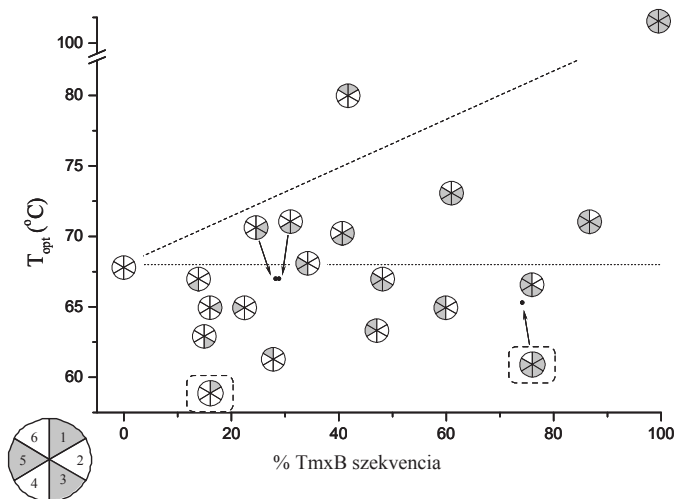
Enzim: T _{opt}	Enzim: T _{opt}	Enzim: T _{opt}
TmxAcet: 68 °C	B ₂ A ₄ : inaktív	A ₃ B ₃ : 65 °C
TmxB: 102 °C	AB ₂ A ₃ : 67 °C	B ₄ A ₂ : inaktív
BA ₅ : inaktív	A ₂ B ₂ A ₂ : 67 °C	AB ₄ A: 73 °C
ABA ₄ : 65 °C	A ₃ B ₂ A: 68 °C	A ₂ B ₄ : 66 °C
A ₂ BA ₃ : 63 °C	A ₄ B ₂ : 63 °C	B ₅ A: inaktív
A ₃ BA ₂ : 67 °C	B ₃ A ₃ : inaktív	AB ₅ : 71 °C
A ₄ BA: 65 °C	AB ₃ A ₂ : 70 °C	BA ₄ B: 80 °C
A ₅ B: 61 °C	A ₂ B ₃ A: 67 °C	

5.2. táblázat A kiméra konstrukciók sematikus ábrázolása, feltüntetve az optimális működési hőmérsékletüket. Az egyszerűsített elnevezések a a megfelelő sorrendű szegmens összetételt jelképezik képletszerűen.

A cél az volt, hogy egy-öt egymást követő szegmenst a hipertermofil xilanázból beépítsek a termofil enzim megfelelő helyére az összes lehetséges variációban és az optimális működési hőmérsékletekben bekövetkezett változást elemzem. A hús kiméra enzim jellemzése közben felfigyeltem az N- és C-terminális láncvégek közötti kölcsönhatások lehetséges szerepére, ezért elkészítettem azt a konstrukciót is, amelyben a termofil enzim láncvégeit lecseréltem a hipertermofil megfelelőire (BA₄B). A kiválasztott kiméra enzimeket az *Anyagok és módszerek* fejezetben ismertetett három lépésből álló tisztítási protokoll szerint tisztítottam, amelynek eredményeként minden esetben legalább 85%-os tisztaságú fehérjeoldatokat kaptam.

5.2.2. A vad típusú és a kiméra xilanázok hőstabilitásának jellemzése

A xilanázok aktivitását először hőkezelt (50 °C 30 perc), rekombináns *E. coli* sejtekből készített sejtmentes kivonatban ellenőriztem és határoztam meg. A kiméra enzimek optimális működési hőmérséklete a 61-80 °C tartományba esett. A legstabilisabb kimérának 12 °C-kal magasabb volt az optimális működési hőmérséklete, mint a vad típusú termofil enzimnek. A mért adatokat az 5.2. táblázat foglalja össze. Az 5.4. ábra az optimális működési hőmérsékleteket szemlélteti a hipertermofil TmxB enzimből származó szekvencia arányában.



5.4. ábra A kiméra és a vad típusú xilanázok optimális működési hőmérsékletei a TmxB enzimből származó szekvenciárészlet százalékában. A kör alakú ábrázolások a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó gyűrű alakjára utalnak. A pontozott és sima körök a TmxB illetve a TmxAcet enzimből származó szegmenseket szemléltetik, a számozás pedig az N-terminálistól indul a C-terminális felé, ahogy az ábra bal alsó sarkában látható illusztráció ábrázolja. A szaggatott vonallal körberajzolt körök azokat a kimérákat szemléltetik, amelyek nem voltak aktívak xilán szubsztráton, ezért ezen enzimek esetében az első olvadáspontot (T_{m1}) ábrázoltam. A vízszintes pontozott vonal a termofil TmxAcet optimális működési hőmérsékletét, a szaggatott vonal a TmxB szekvenciaarány és az optimális működési hőmérséklet közötti elméleti lineáris összefüggést ábrázolja.

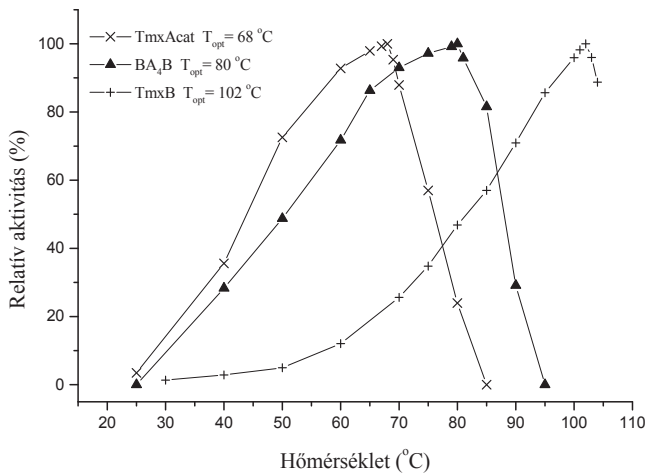
Az aktivitásmérés eredményei alapján részletesebb jellemzésre (CD, DSC) kiválasztottam azt a hat kimérát, amelyben az N- vagy a C-terminális vagy mindkét szegmenst lecseréltem. A kimérák optimális működési pH-ja a vad típusú enzimekével hasonló tartományba

esett (pH 5.6-6.0), és mindegyik enzim a pH 4.5-8.5 tartományban mutatott aktivitást. Csak kis különbségeket észleltem a pH függvényében mért stabilitás profilokban.

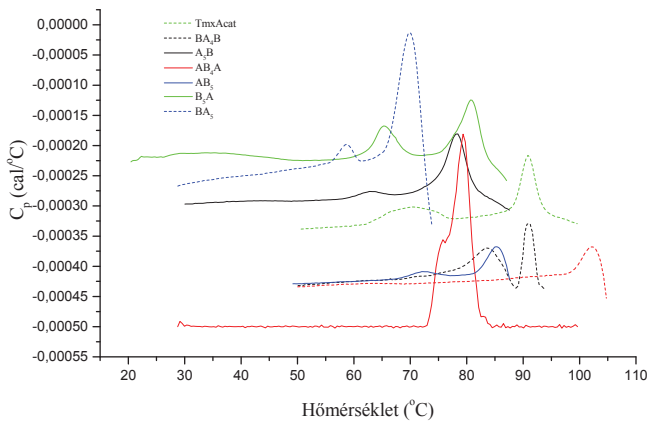
A kimérákat összehasonlítottam a TmxAcet és TmxB fehérjékkel az optimális működési hőmérséklet és az olvadáspontok tekintetében (5.3. táblázat). A BA₄B kiméra volt a legstabilisabb, optimális működési hőmérséklete 12 °C-kal volt magasabb, mint a termofil TmxAcet enzimé (5.5. ábra). A másik öt kiméra optimális működési hőmérséklete a termofil enzim optimális működési hőmérsékletéhez hasonló vagy annál kisebb volt. Azok a kimérák (pl. BA₅ és B₅A), amelyeknél az N-terminális termofil szegmenst cseréltem a hipertermofil megfelelőjére, a kicserélt szegmens hosszától függetlenül minden esetben inaktívnak bizonyultak. A kimérák és a termofil TmxAcet enzim kalorimetriás görbéi két olvadáspontot adtak (5.6a. és 5.6b. ábrák). Az első olvadáspont (T_{m1} az 5.3. táblázatban), amely általában az optimális működési hőmérséklet közelébe esik, egy reverzibilis változás a harmadlagos szerkezetben, amely az enzim gyors inaktivációját eredményezi. A második csúcs a teljes szerkezet irreverzibilis letekeredésére utal. A kalorimetriás mérések szerint minden enzim hőindukált letekeredése irreverzibilis volt, és minden esetben egyértelmű fehérje kicsapódást észleltem.

Enzim	T_{opt} (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
TmxAcet	68	70.4	91.1
BA ₅	inaktív	58.7	69.8
A ₅ B	61	63.2	78.3
BA ₄ B	80	84.1	91.0
TmxB	102	102.5	-
B ₅ A	inaktív	65.3	80.8
AB ₅	71	72.3	85.5
AB ₄ A	73	75.5	79.6

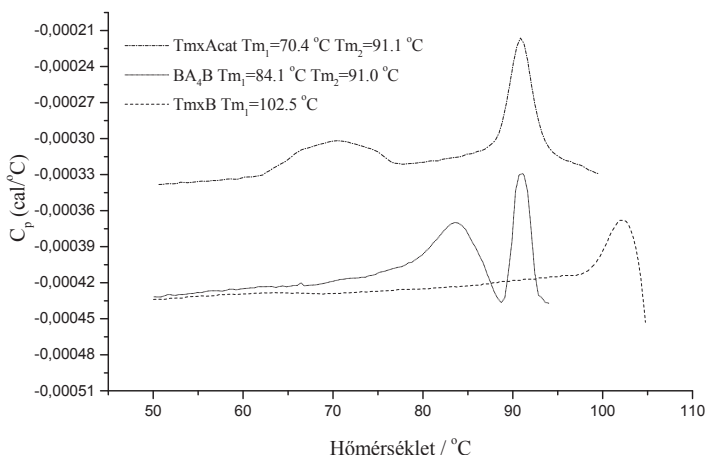
5.3. táblázat A vad típusú és a kiméra enzimek optimális működési hőmérsékletei (T_{opt}) és olvadáspontjai (T_{m1} and T_{m2}).



5.5. ábra A vad típusú enzimek és a legstabilisabb kiméra aktivitás profilja a hőmérséklet függvényében



5.6a. ábra A vad típusú enzimek és a kiválasztott kimérák kalorimetriás görbéi



5.6b. ábra A vad típusú enzimek és a legstabilisabb kiméra kalorimetriás görbéi

Az eredmények azt mutatják, hogy csak az egyik láncvégi szegmens lecserélése a termofil TmxAcet enzimben a megfelelő hipertermofil szegmensre a TmxB fehérjéből destabilizációt eredményez (BA_5 és A_5B kimérák), míg mindkét láncvégi szegmens egyidejű cseréje esetén (BA_4B kiméra) szignifikáns stabilizációt észleltem (ld. 5.3. táblázat). Az AB_3 , B_3A és AB_4A kimérák esetében ugyanezt a hatást tapasztaltam. Annak ellenére, hogy az AB_4A kiméra kisebb szegmenst tartalmaz a hipertermofil enzimből, mint az AB_5 és B_3A kimérák, az optimális működési hőmérséklete és az első olvadáspontja magasabb mindkettőjénél.

Numata és mtsai egy korábbi tanulmányukban kiméra izopropilmalát-dehidrogenáz enzimeket állítottak elő egy termofil és egy mezofil enzimből kiindulva. Arról számoltak be, hogy a kiméra enzimek hőstabilitása közel arányos a termofil enzimből származó szekvenciárészlet nagyságával, ami azt sejteti, hogy a stabilizáló tényezők egyenletesen oszlanak el a szekvencia mentén. Ezzel ellentétben a *Thermotoga maritima* xilanázok esetében az optimális működési

hőmérséklet nem monotonon növekszik a hipertermofil összetevők arányának növekedésével. A 40% TmxB szekvenciárészletet tartalmazó kiméra rendelkezik a legmagasabb ($T_{\text{opt}} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) optimális működési hőmérséklettel. Ezentúl, a legtöbb kiméra (12 a 16 aktív enzimből) alacsonyabb optimális működési hőmérséklettel rendelkezik, mint a termofil TmxAcat enzim. A négy, termofil enzimmél magasabb optimális működési hőmérséklettel rendelkező enzim közül háromnak alacsonyabb a hőmérsékleti optimuma, mint amit a lineáris összefüggés alapján várnánk. A BA₄B kiméra viszont nagyobb hőstabilitású az elméleti lineáris összefüggés alapján vártnál képest.

Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a 10-es családba tartozó xilanázok esetében a stabilizáló tényezők nem egyenletesen oszlanak el a szekvencia mentén, inkább a láncvégi régiók, különösen a láncvégek közötti kölcsönhatások járulnak hozzá erőteljesebben az enzim globális stabilitásához, mint a fehérje többi része.

5.2.3. A vad típusú és a kiméra xilanázok reakciókinetikai paraméterei

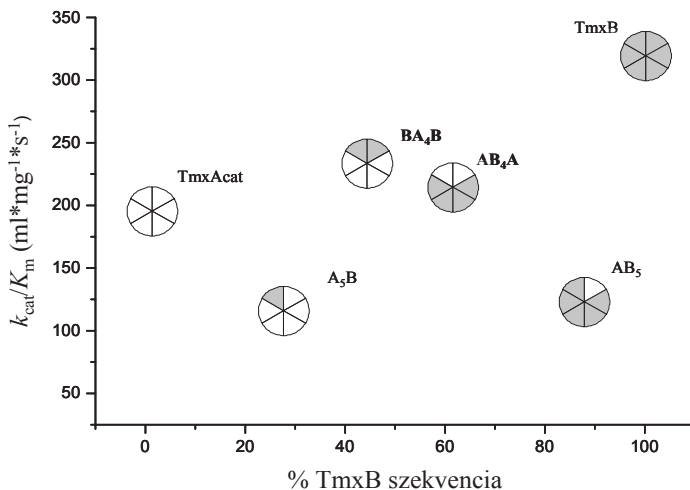
A részletes jellemzésre kiválasztott hat kiméra közül négynek volt enzimatis aktivitása. Az egyes enzimek kinetikai paramétereit az optimális működési hőmérsékletükön határoztam meg. A mérési eredményekből számolt kinetikai állandókat az 5.4. táblázatban foglaltam össze.

Enzim	K_m (mg*ml ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (ml*mg ⁻¹ *s ⁻¹)
TmxAcat	5,15	1024	199
TmxB	3,89	1256	323
AB ₄ A	4,12	895	218
AB ₅	4,75	612	129
A ₅ B	5,02	591	118
BA ₄ B	4,55	1068	235

5.4. táblázat A vad típusú és az enzimaktivitást mutató kimérák kinetikai paraméterei xilán szubsztráton

A kiméra enzimek K_m értékei a vad típusú enzimek értékeinek 30%-os határán belül mozogtak.

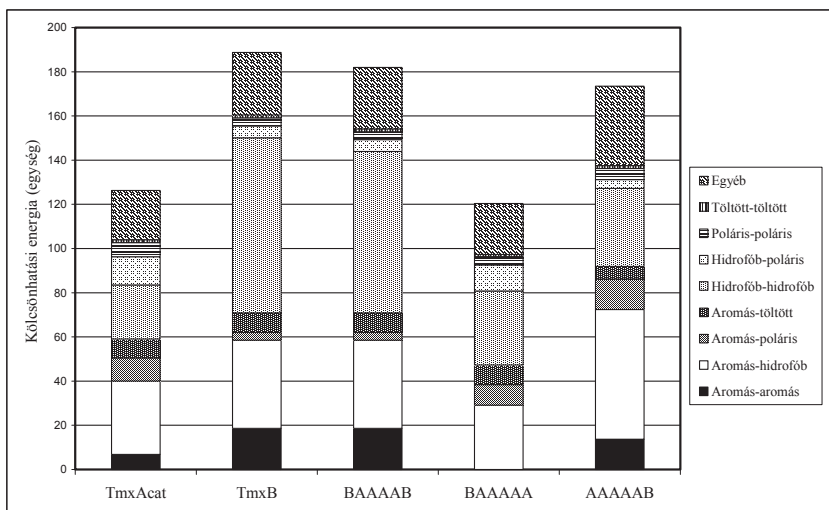
Ennél nagyobb eltéréseket tapasztaltam a k_{cat} értékek esetében. Azon kimérák esetében, amelyekben a láncvégek azonos enzimből származnak (AB_4A és BA_4B), a k_{cat} értékek kis különbséget mutatnak a vad típusú enzimek paramétereire képest, míg a különböző vad típusú enzimekből származó láncvégi szegmenseket tartalmazó kimérák (A_3B és AB_5) k_{cat} értékei fele a vad típusú enzimek értékeinek. A k_{cat}/K_m értékei esetén is hasonló állításokat tehetünk. Az 5.7. ábra a k_{cat}/K_m értékeket mutatja a hipertermofil TmxB enzimből származó szekvenciárészlet arányának függvényében.



5.7. ábra A kiméra xilanázok k_{cat}/K_m értékeinek függése a hipertermofil enzimből származó szekvenciárészlet arányától

5.2.4. A láncvégek közötti kölcsönhatási energia számítása

A TmxB röntgenszerkezetét és a TmxAcet, BA₄B, A₅B és BA₅ enzimek homológia modelljeit felhasználva kiszámoltuk az N-terminális 50 aminosav és a C-terminális 250. aminosav utáni szegmens közötti kölcsönhatási energiákat. A számításokhoz kijelölt két terminális nagyjából megegyezik az egyes és hatos szegmensekkel. Az 5.8. ábra a számított energiák abszolút értékeit ábrázolja (a nagyobb érték erősebb kölcsönhatást jelent), valamint a különböző típusú energiák hozzájárulását a teljes kölcsönhatási energiához is megadja.



5.8. ábra Az enzimek N- és C-terminálisa közötti számított kölcsönhatási energiák. A kölcsönhatási energiák statisztikai alapon, a Boltzmann-eloszlás alapján definiált effektív kontaktusenergiák, amelyek RT egységekben értendők.

A TmxB esetében a láncvégek közötti kölcsönhatási energia sokkal kedvezőbb, mint a TmxAcet esetében (-189 vs. -126 egység), köszönhetően az aromás-aromás, aromás-hidrofób és hidrofób-hidrofób kontaktusoknak. A BA₄B kiméra esetében a kölcsönhatási energia és

összetétele a vártak megfelelően majdnem ugyanaz, mint TmxB fehérjében. A BA₅ kimérában a teljes kölcsönhatási energia kedvezőtlenebb (-120 egység) még a TmxAcet fehérje értékénél is, és a különböző kölcsönhatás típusok relatív hozzájárulása hasonló a TmxAcet fehérje esetében számoltakkal, amelyet a kevés aromás-hidrofób és hidrofób-hidrofób kontaktus jellemez. Ez azt jelenti, hogy az N-terminális hipertermofil szegmens és a C-terminális termofil szegmens nem illeszkedik megfelelően egymáshoz. Az A₅B kiméra viszont elég kedvező kölcsönhatási energia értékkel rendelkezik (-173 egység), csak néhány megszünt kontaktus fedezhető fel a TmxB fehérjéhez hasonlítva. A TmxAcet, TmxB és BA₄B, BA₅ enzimekre számított kölcsönhatási energiák azonos tendenciát mutatnak a hőkapacitási görbéken azonosított első olvadási hőmérséklettel. Az A₅B kiméra esetében számított kölcsönhatási energiák nagyobbak, mint amit előzetesen vártunk volna a mért olvadási hőmérsékletek alapján. A mért adatokkal mégis annyiban összecseng, hogy az A₅B kiméra stabilisabb, mint a BA₅ kiméra.

Következtetések

A $(\beta/\alpha)_8$ -hordó gyűrűszerű szerkezetéből következik, hogy a két láncvégi (β/α) szegmens egymás közelében helyezkedik el, ezért képesek hasonló kölcsönhatásokat kialakítani, mint a szomszédos (β/α) egységek. Néhány vizsgálat megmutatta, hogy ezek a régiók fontos szerepet játszanak a stabilitásban. A *Thermotoga maritima* mikroorganizmusból származó indoglicerol-foszfát szintáz fehérje esetében egy sóhíd stabilizációs szerepét, miszerint az N-terminálist rögzíti a molekula magjához, demonstrálták, egy másik sóhídról pedig bebizonyosodott, hogy az α_1 and α_8 hélixeket összekötve járul hozzá a stabilitás növeléséhez (Merz és mtsai, 1999). A *Cellvibrio japonicus* mikroorganizmusból származó CjXyn10A xilanázt a láncvégek között kialakított diszulfidhíd segítségével stabilizálták (Andrews és mtsai, 2004).

A $(\beta/\alpha)_8$ -hordó fehérjék letekeredési útjainak tanulmányozása különböző, a 6+2 és a 3+3+2 mechanizmusokhoz vezetett, amelyekben közös (és erre utal a +2 a számokkal jelzett elnevezésekben), hogy a letekeredés kezdeti lépése az utolsó két (β/α) egység szétesése (Akanuma és mtsai, 2005, Silverman és Harbury, 2002). Mind a kovalens keresztkötések, mind a nem kovalens kölcsönhatások erősítése a fehérje két szekvenciálisan távoli peptid szegmense között növeli a fehérje konformációs stabilitását, de különböző mechanizmusokkal. A kovalens keresztkötések a letekeredett állapot entrópiáját csökkentik, egyenes arányosan a keresztkötést létrehozó két aminosav közötti aminosavak számának logaritmusával, míg a nem kovalens kölcsönhatások a letekeredés aktiválási energiáját növelik azokban az esetekben, amikor az adott szegmensek disszociációja a sebesség meghatározó lépés a letekeredés folyamán.

Az eredményeim azt sugallják, hogy egy termofil és egy hipertermofil $(\beta/\alpha)_8$ -hordó enzim szegmenseinek kombinálásával egyszerű és hatékony módon tudunk tervezett optimális működési hőmérsékletű és szerkezeti stabilitású enzimeket előállítani. Azonban nem minden kiméra konstrukció esetében tapasztaltam a várt magasabb hőstabilitást, ami arra tanít bennünket, hogy a kicserélendő szegmens és környezete közötti kölcsönhatás hálózatot vizsgálni kell, amikor egy szegmenst kijelölünk cserére; még egy nagy lokális hőstabilitással rendelkező szegmens

beépítése is vezethet destabilizációhoz, ha a környezetével való kölcsönhatások kedvezőtlenek. Egyszerű és hatékony módja a hőstabilitás növelésének kovalens keresztkötés beépítése is, mivel a láncvégek általában távol esnek az aktivitásért felelős aminosavaktól, ezért a szerkezet megbolygatása szempontjából kis kockázattal járó beavatkozás.

6. Összefoglalás

A láncvégek közötti kölcsönhatások növelésével sikerült irányított és véletlenszerű módon is hőstabilitás növekedést elérni. Mind a kovalens keresztkötéssel, mind a nem kovalens kölcsönhatások erősítésével, a fehérje két szekvenciálisan távoli peptid szegmense között, növeltem a modell enzimek konformációs stabilitását. A modellenzimeken végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó enzimek esetében a láncvégek közötti kölcsönhatásoknak lényeges hozzájárulása van a hőstabilitáshoz.

A fehérjék tulajdonságainak célirányos módosítása mind elméleti, mind gyakorlati szempontból érdekes és fontos feladat. A biotechnológia területén már alkalmaznak olyan enzimeket, amelyek mesterségesen módosított szerkezetükkel jobban megfelelnek egy-egy adott feladat elvégzésére, azonban még messze vagyunk attól, hogy tetszőlegesen tudjuk alakítani az enzimek stabilitását, pH optimumát, szubsztrát specificitását és egyéb tulajdonságait.

A hőstabilitás növelése ezek közül nagy jelentőséggel bíró feladat. Az évtizedek óta tartó kutatások számos szerkezeti tényező fontosságára mutattak rá a (hiper)termofil enzimek nagyobb stabilitásának kialakulásában, külön ki kell azonban emelni az elektrosztatikus kölcsönhatás jelentőségét, amit statisztikai vizsgálatok és a kutatócsoportunkban elvégzett korábbi vizsgálatok igazolnak, illetve a láncvégek közötti kölcsönhatások fontosságát, amelyet az általam végzett kísérletek támasztanak alá. A "termostabilitás" mint tulajdonság nem, vagy csak ritkán köthető egy-egy aminosavhoz, inkább jelentkezik a polipeptid lánc mentén elosztva, az oldalláncok kölcsönhatásainak optimalizálásán keresztül, ezért egy fehérje stabilitásának jelentős növelése nehezen valósítható meg pontmutációkkal. A számítógépek sebessége és az elméletek teljesítőképessége ma még nem elegendő ilyen komplexitású feladatok megoldásához. Ugyanakkor néhány egyszerű elmélet és módszer segítségével sikerült eredményeket elérnem a hőstabilitás növelése illetve optimalizálása terén, ami ígéretes a további munka szempontjából.

Doktori dolgozatomban a hipertermofil homológ párral nem rendelkező, mérsékelt termofil *Clostridium thermocellum* celluláz C enzim esetében olyan pontmutáció kialakításával

próbáltam az enzim stabilitását növelni, amelytől általánosságban a stabilitás növekedését várhatjuk. Egy megfelelően megtervezett diszulfidhíd segítségével, az N- és a C-terminális régió összekapcsolásával sikerült egy olyan mutációt létrehozni, amely jelentős mértékben megnövelte a celluláz C enzim stabilitását. A fehérjék letekeredése gyakran a terminális régióknál kezdődik, amelyek általában nincsenek szorosan beépülve a szerkezetbe. Az általam tervezett mutációval kapott eredmények rávilágítanak a terminális régiók fontosságára a stabilitás szempontjából. Elvégeztem a mutációt tartalmazó enzim termodinamikai és kinetikai stabilitásának vizsgálatát is (a következő módszerekkel: CD spektroszkópia, differenciális pásztázó mikroklorimetria és hőinaktivációs mérések), amelyek mind a mutáció stabilizáló hatását mutatták. A guanidin-hidroklorid denaturációs mérésekkel a mutáció által okozott stabilitásnövekedés termodinamikai jellemzését végeztem el. A mérések alapján a diszulfidhíd kialakulása 1,73 kcal/mol-lal stabilizálta a natív szerkezetet. A kinetikai vizsgálatok alapján a mutáns féléletideje háromszorosára emelkedett a vadtypushoz képest.

A *Thermotoga maritima* teljes genomsekvenciájának publikálása után sikerült két olyan xilanáz fehérjét találni a baktérium genomjában, amelyek jelentős hasonlóságot mutatnak és együtt egy termofil és egy hipertermofil enzimből álló modellrendszert alkotnak. Elvégeztem a *Thermotoga maritima* xynB és xynAcat gének klónozását. A szerkezeti összehasonlítás céljából, a már ismert xilanáz B enzim röntgenszerkezete mellé homológia modellezéssel felépítettem a xilanáz A katalitikus domén lehetséges szerkezetét. A két, a celluláz C enzimhez hasonlóan (β/α)₈-hordó szerkezettel rendelkező, xilanázból kiindulva, a family shuffling módszer ésszerűsítésével, 21 kiméra enzimet állítottam elő, amelyből 16 bizonyult aktívnak. A kimérák optimális működési hőmérsékletei nem mutattak monoton összefüggést a hipertermofil vadtypusú enzimből származó szekvencia részlet nagyságával. Négy kimérának volt magasabb az optimális működési hőmérséklete, mint a termofil TmxAcac fehérjének, a legstabilisabb variáns az lett ($T_{opt} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$), amelyben a láncvégi szegmenseket cseréltem le

A kiméra konstrukciók további szerkezeti vizsgálata és bioinformatikai analízise szerint a

Thermotoga maritima xilanázok esetében az optimális működési hőmérséklet nem monotonon növekszik a hipertermofil összetevők arányának növekedésével, az N- és C-terminális szegmensek közötti kölcsönhatásoknak aránytalanul nagyobb hozzájárulása van a molekula teljes stabilitásához. Az eredmények várhatóan alkalmazhatók egyéb olyan $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezettel rendelkező fehérjére, ahol a két láncvégi régió kellő közelségben van egymáshoz. A kísérleteim azt is bizonyítják, hogy az 50% vagy alacsonyabb azonosságot mutató gének esetében a racionális family shuffling alkalmazható az ipari szempontból is érdekes enzimek hőstabilitásának optimalizálására.

Az általam végzett kísérletek eredményei rávilágítanak a terminális régiók és a köztük lévő kölcsönhatások fontosságára a stabilitás szempontjából. A hőstabilitás szerkezeti alapjaiban fontos szerepet játszó, egyre nagyobb bizonyosságot nyerő elektrosztatikus kölcsönhatás mellett a láncvégek közötti kölcsönhatások erősítése egy könnyen tervezhető és nagy eséllyel pozitív eredménnyel szolgáló tényező.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó saját közlemények

Kamondi S., Szilágyi A., Barna L., Závodszky P., Engineering the thermostability of a TIM-barrel enzyme by rational family shuffling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, Oct 3; **374**(4):725-730.

Németh A., **Kamondi S.**, Szilágyi A., Magyar C., Kovári Z., Závodszky P., Increasing the thermal stability of cellulases C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study. *Biophysical Chemistry* 2002, May 2; **96**(2-3):229-41.

Hivatkozások

- Akanuma, S., H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Yamagishi. 2005. A detailed unfolding pathway of a (beta/alpha)8-barrel protein as studied by molecular dynamics simulations. *Proteins* **58**:538-546.
- Andrews, S.R., E.J. Taylor, G. Pell, F. Vincent, V.M. Ducros, G.J. Davies, J.H. Lakey, H.J. Gilbert. 2004. The use of forced protein evolution to investigate and improve stability of family 10 xylanases. The production of Ca²⁺-independent stable xylanases. *J. Biol. Chem.* **279**:54369-54379.
- Banner, D.W., A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D.C. Phillips, C.I. Pogson, I.A. Wilson, P.H. Corran, A.J. Furth, J.D. Milman, R.E. Offord, J.D. Priddle, S.G. Waley. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**:609-614.
- Bernfeld, P. 1955 Amylases α and β . *Meth. Enzymol.* **1**:149-158.
- Bloom, J.D., J.A. Jr. Benson. 2005. Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr. Opin. in Struct. Biol.* **15**:447-452.
- Bronnenmeier, K., A. Kern, W. Liebl, and W. L. Staudenbauer. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1399-1407.
- Brock, T.D. 1967. Life at high temperatures. *Science* **158**:1012-1019.
- Burg, B.V., G. Vriend, O.R. Veltman, G. Venema, V. Eijssink. 1998. Engineering an enzyme to resist boiling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:2056-2060.
- Coutinho, P. M. and B. Henrissat. 1999. Carbohydrate-active enzymes server (URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>)

- Creighton, T.E. 1984. Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol.* **107**:305-29.
- Delboni, L.F., S.C. Mande, F. Rentier-Delrue, V. Mainfroid, S. Turley, F.M. Vellieux, J.A. Martial, W.G. Hol. 1995. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions, *Protein Sci.* **4**:2594-2604.
- Dominguez, R., H. Souchon, P.M. Alzari. 1994. Characterization of two crystal forms of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC, *Proteins* **19**:158-160.
- Dominguez, R., H. Souchon, S. Spinelli, Z. Dauter, K.S. Wilson, S. Chauvaux, P. Beguin, P.M. Alzari. 1995. A common protein fold and similar active site in two distinct families of β -glycanases, *Nat. Struct. Biol.* **2**:569-576.
- Eriksson, A.E., W.A. Baase, X.J. Zhang, D.W. Heinz, M. Blaber, E.P. Baldwin, B.W. Matthews. 1992. Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect, *Science* **255**:178-183.
- Fabry, S., R. Hensel. 1987. Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaeobacterium *Methanotermus fervidus*. *Eur J. Biochem.* **165**:147-155.
- Fujiwara, S., Lee S.G., Haruki M., Kanaya S., Takagi M., Imanaka T. 1996. Unusual enzyme characteristics of aspartyl-tRNA synthetase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1. *FEBS Lett.* **394**:66-70.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* (Walker, J.M., ed.) pp. 571-607. Humana Press
- Greer, J. 1990. Comparative modeling methods: application to the family of the mammalian serine

- proteases. *Proteins* **7**:317-334.
- Greer, J. 1991 Comparative modeling of homologous proteins. *Methods Enzymol.* **202**:239-252.
- Hennig, M., S. Pfeffer-Hennig, Z. Dauter, K.S. Wilson, B. Schlesier, V.H. Nong. 1995. Crystal structure of narbonin at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **51**: 177-189.
- Hennig, M., J.N. Jansonius, A.C. Terwisscha van Scheltinga, B.W. Dijkstra, B. Schlesier. 1995. Crystal structure of concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*. *J. Mol. Biol.* **254**:237-246.
- Henrissat, B., A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**:781-788.
- Huang, X., W. Miller. 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**:337-357.
- Ihsanawati, T. Kumasaka, T. Kaneko, C. Morokuma, R. Yatsunami, T. Sato, S. Nakamura, N. Tanaka. 2005. Structural basis of the substrate subsite and the highly thermal stability of xylanase 10B from *Thermotoga maritima* MSB8. *Proteins* **61**:999-1009.
- Jaenicke, R., G. Bohm. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:738-748.
- Jaenicke, R., P. Závodszky. 1990. Proteins under extreme physical conditions. *FEBS Lett.* **268**:344-349.
- Kamondi, S., A. Szilágyi, L. Barna, P. Závodszky. 2008. Engineering the thermostability of a TIM-barrel enzyme by rational family shuffling. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **374**:725-730.

- Kumar, S., C. J. Tsai and R. Nussinov. 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Prot. Eng.* **13**:179-191.
- Kunkel, T.A., J.D. Roberts, R.A. Zakour. 1987. *Methods. Enzymol.* **154**:367-382.
- Maes, D., J.P. Zeelen, N. Thanki, N. Beaucamp, M. Alvarez, M.H. Thi, J. Backmann, J.A. Martial, L. Wyns, R. Jaenicke, R.K. Wierenga. 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **37**:441-53.
- Macedo-Ribeiro, S., B. Darimont, R. Sterner, R. Huber. 1996. Small structural changes account for the high thermostability of 1[4Fe-4S] ferredoxin from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Structure* **4**:1291-1301.
- Matsumura, M., G. Signor, B.W. Matthews. 1989. Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* **342**:291-293.
- Merz, A., T. Knöchel, J.N. Jansonius, K. Kirschner. 1999. The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J. Mol. Biol.* **288**:753-763.
- Miyazawa, S., R.L. Jernigan. 1985. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: quasi-chemical approximation. *Macromolecules* **18**:534-552.
- Nagano, N., C.A. Orengo, J.M. Thornton. 2002 One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* **321**:741-765.
- Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L.

- Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter and C. M. Fraser. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**:323-329.
- Németh, A., S. Kamondi, A. Szilágyi, C. Magyar, Z. Kovári and P Závodszy. 2002. Increasing the thermal stability of cellulases C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study. *Biophys. Chem.* **96**:229-241.
- Notredame, C., D.G. Higgins, J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**:205-217.
- Numata, K., M. Muro, N. Akutsu, Y. Nosoh, A. Yamagishi, T. Oshima. 1995. Thermal stability of chimeric isopropylmalate dehydrogenase genes constructed from a thermophile and a mesophile. *Prot. Eng.* **8**:39-43.
- Pace, C.N. 1988. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**:266-280.
- Pace, C.N., G.R. Grimsley, J.A. Thomson, B.J. Barnett. 1988b. Conformational stability and activity of Ribonuclease T₁ with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **263**:11820-11825.
- Pace, C. N. and Scholtz J. M. 1997. Measuring the conformational stability of a protein. In: Protein structure - a practical approach. pp. 299-321 Oxford University Press, Oxford, New York
- Petre, D., J. Millet, R. Longin, P. Beguin, H. Girard, J.P. Aubert. 1986. Purification and properties of the endoglucanase C of *Clostridium thermocellum* produced in *Escherichia coli*. *Biochimie* **68**:687-695.
- Plaza del Pino IM, Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM. 2000. Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins* **40**:58-70.

- Privalov, P.L., N.N. Khechinashvili. 1974. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86**:665-684.
- Querol, E., J.A. Perez-Pons, and A. Mozo-Villarias. 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Prot. Eng.* **9**:265-271.
- Robinson-Rechavi, M., A. Godzik. 2005. Structural Genomics of *Thermotoga maritima* proteins shows that contact order is a major determinant of protein thermostability. *Structure* **13**:857-860.
- Robinson-Rechavi, M., A. Alibes, A., A. Godzik. 2006 Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: Lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* **356**:547-557.
- Sali, A., T.L. Blundell. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**:779-815.
- Schwarz, W. H., S. Schimming, K. P. Ruecknagel, S. Burgschwaiger, G. Kreil and W. L. Staudenbauer. 1988. Nucleotide sequence of the *celC* gene encoding endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*. *Gene* **63**:23-30.
- Shima, S., C. Tziatzios, D. Schubert, H. Fukada., K. Takahashi., U. Ermler, R. K. Thauer. 1998. Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **258**:85-92.
- Shirley, B.A., P. Stanssens, U. Hahn, C.N. Pace. 1992. Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* **31**:725-732.
- Silverman, J.A., P.B. Harbury. 2002. The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha)₈ barrel. *J. Mol. Biol.* **324**:1031-1040.
- Sowdhamini, R., N. Srinivasan, B. Shoichet, D.V. Santi, C. Ramakrishnan, P. Balaram. 1989.

- Stereochemical modeling of disulfide bridges. Criteria for introduction into proteins by site-directed mutagenesis, *Prot. Eng.* **2**:95-103.
- Spassov, V.Z., A.D. Karshikoff, R. Ladenstein. 1994. Optimization of the electrostatic interactions in proteins of different functional and folding type. *Protein Sci.* **9**:1556-1569.
- Spector, S., M. Wang, S.A. Carp, J. Robblee, Z.S. Hendsch, R. Fairman, B. Tidor, D.P. Raleigh. 2000. Rational modification of protein stability by the mutation of charged surface residues, *Biochemistry* **39**:872-879.
- Sunna, A., M. Moracchi, M. Rossi and G. Antranikian. 1997. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* **1**:2-13.
- Szilágyi, A., and P. Závodszy. 1995. Structural basis for the extreme thermostability of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: analysis based on homology modelling. *Prot. Eng.* **8**:779-789.
- Szilágyi, A., P. Závodszy. 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* **8**:493-504.
- Tanner, J.J., R.M. Hecht, K.L. Krause. 1996 Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5Å resolution. *Biochemistry* **35**:2597-2609.
- Thompson, M.J., D. Eisenberg. 1999. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.* **290**:595-604.
- Thornton, J. M., B.L. Sibanda. 1983. Amino and carboxy-terminal regions in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **167**:443-460.
- Timashef, S.N. 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water. How do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*

22:67-97.

- Tokatidis, K., P. Dhurjati, P. Beguin. 1993. Properties conferred on *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC by grafting the duplicated segment of endoglucanase CelD. *Prot. Eng.* **6**:947-952.
- Vieille, C., Burdette D.S., Zeikus J.G. 1996. Thermozyms. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**:1-83.
- Wakarchuk, W.W., W.L. Sung, R.L. Campbell, A. Cunningham, D.C. Watson, M. Yaguchi. 1994. Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Prot. Eng.* **7**:1379-1386.
- Winterhalter, C., P. Heinrich, A. Candussio, G. Wich, W. Liebl. 1995. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol.* **15**:431-444.
- Winterhalter, C., W. Liebl. 1995. Two Extremely Thermostable Xylanases of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1810-1815.
- Xie, H., J. Flint, M. Vardakou, J.H. Lakey, R.J. Lewis, H.J. Gilbert, C. Dumon. 2006. Probing the structural basis for the difference in thermostability displayed by family 10 xylanases. *J. Mol. Biol.* **360**:157-167.
- Xiong, H., F. Fenel, M. Leisola, O. Turunen. 2004. Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II by combination of disulphide bridges. *Extremophiles* **8**:393-400.
- Zhengqiang, J., A. Kobayashi, M.M. Ahsan, L. Lite, M. Kitaoka, K. Hayashi. 2001. Characterization of a thermostable family 10 endo-xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-beta-D-xyloside. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:423-428.